

815006-3

기술사업화지원사업 제3차 연도 최종보고서

발간등록번호

11-1543000-002660-01

골세포치료제 개발 최종보고서

반려견의 지방유래 간엽줄기세포를 이용한

2019 농림식품기술기획평가원
농림축산식품부

반려견의 지방유래 간엽줄기세포를 이용한 골세포치료제 개발 최종보고서

2019.04.08.

주관연구기관 / (주)세포바이오
협동연구기관 / 경북대학교
협동연구기관 / (주)루젠에스씨아이
협동연구기관 / 농림축산검역본부

농림축산식품부
(전문기관) **농림식품기술기획평가원**

<제출문>

제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

본 보고서를 “반려견의 지방유래 간염줄기세포를 이용한 골세포 치료제 개발”
(개발기간 : 2015.10.23~2018.10.22)과제의 최종보고서로 제출합니다.

2019. 04. 08.

주관연구기관명 : (주)세포바이오 (대표자) 박 현 중 (인)
제 1 협동연구기관명 : 경북대학교 (대표자) 임 기 병 (인)
제 2 협동연구기관명 : (주)루젠에스씨아이 (대표자) 박 성 호 (인)
제 3 협동연구기관명 : 농림축산검역본부 (대표자) 박 봉 권 (인)

주관연구책임자 : 이순례
제 1 협동연구책임자 : 정규식
제 2 협동연구책임자 : 이종민
제 3 협동연구책임자 : 차상호

국가연구개발사업의 관리 등에 관한 규정 제18조에 따라 보고서 열람에 동의
합니다.

<보고서 요약서>

보고서 요약서

과제고유번호	815006-3	해 당 단 계 연구 기 간	1단계 3년차	단 계 구 분	1단계/1단계
연구사업명	단 위 사 업	농식품기술개발사업			
	사 업 명	기술사업화 지원사업			
연구과제명	대 과 제 명	(해당 없음)			
	세부 과제명	반려견의 지방유래 간염줄기세포를 이용한 골세포 치료제 개발			
연구책임자	해당단계 참여연구원 수	총: 16명 내부: 명 외부: 명	해당단계 연구개발비	정부:840,000천원 민간:280,050천원 계:1,120,050천원	
	총 연구기간 참여연구원 수	총: 16명 내부: 명 외부: 명	총 연구개발비	정부:840,000천원 민간:280,050천원 계:1,120,050천원	
연구기관명 및 소속부서명	(주)세포바이오 기업부설연구소			참여기업명 (주)세포바이오	
국제공동연구	상대국명:			상대국 연구기관명:	
위탁연구	연구기관명:			연구책임자:	

※ 국내외의 기술개발 현황은 연구개발계획서에 기재한 내용으로 같음

연구개발성과의 보안등급 및 사유	
-------------------------	--

9대 성과 등록·기탁번호

구분	논문	특허	보고서 원문	연구시설 ·장비	기술요약 정보	소프트 웨어	화합물	생명자원		신품종	
								생명 정보	생물 자원	정보	실물
등록·기탁 번호	1건	1건	4건						2건		

국가과학기술종합정보시스템에 등록된 연구시설·장비 현황

구입기관	연구시설· 장비명	규격 (모델명)	수량	구입연월일	구입가격 (천원)	구입처 (전화)	비고 (설치장소)	NTIS 등록번호

요약(연구개발성과를 중심으로 개조식으로 작성하되, 500자 이내로 작성합니다)
 개과동물의 지방유래 간엽줄기세포은행 확립
 개과동물의 지방유래 간엽줄기세포 배양을 위한 배양액 개발 및 상용화
 개과동물의 지방유래 간엽줄기세포를 이용한 반려견용 세포치료제 Smart Cell®
 cBone 개발
 반려견용 세포치료제 Smart Cell®cBone에 대한 종양원성 확인 - GLP기관 보
 고서 확보
 반려견용 세포치료제 Smart Cell®cBone에 대한 투여독성 확인 - GLP기관 보
 고서 확보
 반려견용 세포치료제 Smart Cell®cBone에 대한 분포시험 자료 확보
 반려견용 세포치료제 Smart Cell®cBone에 대한 소동물 및 개과동물 유효성 평
 가 보고서 확보
 논문 출간 1건, 특허 출원 1건
 농림축산검역본부 개과동물유래 지방줄기세포 및 말뺫줄유래줄기세포 기탁

보고서 면수

<요약문>

<p>연구의 목적 및 내용</p>	<ul style="list-style-type: none"> • 개의 간엽줄기세포 배양 및 분화 조건을 확립 • 3차원 골분화방법을 적용하여 골세포치료제 개발을 위한 프로토콜 확보 • 소동물 모델에서 세포치료제의 안전성과 유효성 검증 • 최종적으로 목적 동물인 개의 생체내 유효성을 확인 • 동물세포치료제를 위한 안전성 및 유효성 근거 확보 				
<p>연구개발성과</p>	<p>제1세부 : (주)세포바이오</p> <ul style="list-style-type: none"> • 반려견에 대한 치료제용 세포 확보 • 배지 상용화 및 동물세포치료제 목적동물임상용 시제품 제작 • 동물세포치료제 개발관련 특허 출원 • 세포치료제 형광 추적에 위한 세포 라벨링 프로토콜 완성 • 종양원성 시험 완료 및 자료 확보 • 장기독성 시험 완료 및 자료 확보 • 투여독성 시험 및 분포시험 완료 • 소동물(동국대) 및 개과동물(경북대)을 이용한 유효성 평가 <p>제1협동 : 경북대학교 (중대동물)</p> <ul style="list-style-type: none"> • 세포-지지체 복합체의 중대동물 적용 프로토콜 확립 • 임상에서의 적용시 전달기법 및 이식술 확립 및 검증 • 목적동물 임상 실시 및 보고서 확보 • 논문작성 <p>제2협동 : 동국대학교</p> <ul style="list-style-type: none"> • in vivo 소동물 유효성 시험 완료 • 치료세포의 형광 입자 표지 및 in vivo 추적 시험 완료 • 세포바이오와 공동으로 종양원성 시험 완료 <p>제3협동 : 농림축산검역본부</p> <ul style="list-style-type: none"> • 반려견 골세포치료제 평가 가이드라인 제시 • 안전성 평가 관련 자문 • in vitro 안전성 평가 				
<p>연구개발성과의 활용계획 (기대효과)</p>	<p>개과 동물 유래 간엽줄기세포와 이를 배양하기 위한 배양액은 연구소재로 상용화 하였고, 동물세포치료제는 시제품을 제작하여 목적동물 유효성 평가를 실시하였으며 소동물 비임상 시험을 통하여 안전성과 유효성을 모두 확인함으로써 안전한 동물세포치료제를 개발하였음</p> <p>동물세포치료제는 2017년 가이드라인이 발표되고 2018년 2월 법안이 발표됨에 따라 관련 산업에 급격한 환경 변화가 있었으며 허가보다는 시술자의 판단에 무게가 실리게 됨에 따라 치료제 허가에 앞에 선 상용화를 진행하기 위해 시판용 세포치료제를 생산하였고 동물병원을 대상으로 한 홍보를 진행할 예정임. 줄기세포 연구개발기업에는 새로운 캐시카우로서 매출 확대에 기여할 것으로 기대함.</p> <p>반려동물 돌봄가구 1000만 시대에 관련시장도 2조원으로 지속적으로 확대되고 있는 상황에서 2020년 6조원으로 성장할 것으로 기대되고 있으며, 이에 따라 반려동물의 복지·보건의료에 대한 질적 성장도 필수적인 것으로 예상할 수 있음</p> <p>반려동물용 세포치료제는 동물과 인류가 더불어 사는 사회에 부합하며 앞으로 선도적인 치료제로서 반려동물 보건의료 패턴 변화에 많은 영향을 줄 것 기대됨</p> <p>본 연구 사업으로 개발된 반려견용 골세포치료제는 동물용 세포치료제 개발 및 산업화의 시작이 되며, 제안된 세포치료제 평가방법은 동물용 골세포치료제의 개발에 대한 평가 가이드라인에 있어 참고자료가 될 것으로 사료됨</p>				
<p>국문핵심어 (5개 이내)</p>	반려동물	개과	3차원 골분화	세포치료제	간엽줄기세포
<p>영문핵심어 (5개 이내)</p>	Pets	Canine	3D Osteogenesis	Cell therapy	mesenchymal stem cells

※ 국문으로 작성(영문 핵심어 제외)

<본문목차>

< 목 차 >

1. 연구개발과제의 개요	7
2. 연구수행 내용 및 결과	19
3. 목표 달성도 및 관련 분야 기여도	61
4. 연구결과의 활용 계획 등	66
붙임. 참고 문헌	67

<별첨> 주관연구기관의 자체평가의견서

<뒷면지>

주 의

1. 이 보고서는 농림축산식품부에서 시행한 농식품기술개발사업의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표하는 때에는 반드시 농림축산식품부에서 시행한 농식품기술개발사업의 연구 결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니됩니다.

1. 연구개발과제의 개요

1-1. 연구개발 목적

구분	내용
최종목적	개의 간엽줄기세포 배양 및 분화 조건을 확립하고 3차원 골분화 방법을 적용하여 골세포치료제 개발을 위한 프로토콜을 확보하고자 하며, 소동물 모델에서 세포치료제의 안전성과 유효성을 검증하고 최종적으로 목적 동물인 개의 생체 내 유효성을 확인함으로써 동물세포치료제 허가를 위한 근거를 확보하고 사업화를 목표로 함
세부목적	<p>제1세부 : 세포바이오</p> <ul style="list-style-type: none"> ○ in vivo / in vitro 시험결과 확보 및 세포치료제의 동물의약품 허가를 위한 자료 수립과 사업화 준비 <p>제1협동 : 경북대학교</p> <ul style="list-style-type: none"> ○ 확립된 중대동물 모델을 기반으로 목적동물 임상시험을 실시하고 평가함 <p>제2협동 : 동국대학교</p> <ul style="list-style-type: none"> ○ 최적화된 소동물 골재생 동물모델을 이용하여 최종 선정된 임상적용치료제의 생체 내 독성, 면역독성 및 종양원성을 평가함. <p>제3협동 : 농림축산검역본부</p> <ul style="list-style-type: none"> ○ 반려견 골세포치료제 평가 가이드라인 최종안 제시

1-2. 연구개발의 필요성

- 줄기세포 관련 연구 분야는 연구개발비 및 투자가 매년 매우 높은 비율로 증가하고 있는 상황이며 연평균 24.2% 성장을 보이고 ‘11년 262.3억 달러에서 ’18년 1195.1억 달러 규모에 이를 것으로 전망되고 있으며, 국내 줄기세포 연구 분야도 매년 급성장 중이며 ‘14년 1월 기준 총 33건의 임상시험이 승인된 상태임.

〈표. 국내 줄기세포 치료제 임상승인 현황〉

전체(건수)	세포기원별		세포유래별		
	자가	동종	골수유래	제대혈유래	지방유래
33	17	16	9	11	13

Ref : 식품의약품안전처, 보도자료 (2014.2.27.)

- 줄기세포 연구개발비 규모는 성체줄기세포 557.1억원(51.6%), 배아줄기세포를 포함한 전분화능 줄기세포 362.4(33.6%)를 차지하고 있으며, 미래부와 복지부에서 80%이상을 지원하고 있으며 이는 전 세계적으로 줄기세포를 차세대 산업의 원동력으로 인식하고 연구개발에 투자하고 있음을 보여주는 것임.

< 주요국가별 줄기세포 연구정책 현황 >



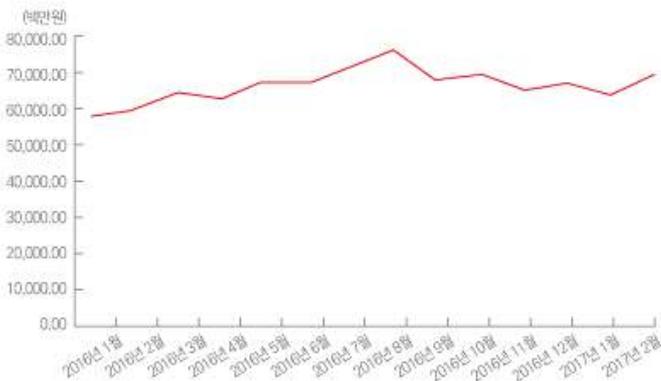
Ref : 2014년 줄기세포연구개발 시행계획 (범부처)

- 세계 바이오산업은 2004년 5,400억 달러에서 2008년 7,700억 달러로 높은 성장률을 보이고 있으며, 2020년에는 1조3000억 달러로 확대될 것으로 전망됨. 시장이 급속도로 확대되는 추세임.
- 세포치료제의 개발은 연구개발 기간도 길고 성공여부도 불확실성이 높아 줄기세포 관련 바이오업계의 블루칩이기도 하지만 개발이후에도 승인 및 허가과정이 길어 실질적으로 제품화되어 경제적 수입과 효과를 나타내는데 시간이 걸려 위험요소가 되기도 함.
- 인간 외에 동물과 관련된 줄기세포 치료 성공사례는 지속적으로 증가하고 있지만 이는 인간 줄기세포 치료제의 효능 혹은 안전성을 확보하기 위한 비임상 시험이나 사전 시험에 불과함.

■ 월별 신용카드 사용액

연도	사용액
2016년 1월	57,089.63
2016년 2월	58,937.14
2016년 3월	63,812.09
2016년 4월	62,080.93
2016년 5월	66,515.00
2016년 6월	66,398.20
2016년 7월	70,223.37
2016년 8월	75,048.55
2016년 9월	66,941.12
2016년 10월	68,631.16
2016년 11월	64,959.33
2016년 12월	65,812.40
2017년 1월	63,512.99
2017년 2월	68,162.74

단위:100만원



<동물병원 월간 카드승인금액 (출처: 한국은행경제통계시스템 ECOS)>

- 국내 반려동물 시장의 경우 현재 2조 원대에 이르고 있으며 고령화 심화와 1인 가구 증가 등의 사회 현상에 기인하여 반려동물을 기르는 가구가 증가하여 국내 전체 가구의 18% 가

량이 1,000만 마리 이상의 동물을 기르는 것으로 집계됨.

- 대한민국에서 길러지는 반려동물 중 가장 많은 수를 차지하는 동물 종은 ‘개’로서 2012년 검역본부가 발표한 추산치는 약 439만 7천275마리임.

〈표. 반려동물 관련 신용카드〉

카드사	카드명	상품	비용	서비스 내용	기타
BC카드		강아지 케어 서비스	카드 종류와 관계없이 매월 16,500원 결제	가입 초년 웰컴박스 / 연 1회 생일선물 장례비 20만원 지원 애견압과 당뇨진단비 각각 15만원씩 지원	
IBK기업은행	참좋은 내사랑 펫카드		연회비 10,000원	동물병원 및 반려동물 업종 이용 시 10% 할인 / 반려동물 전용 장례식장 5%할인	전 카드 실적에 따라 할인율 변경
KB국민카드	KB국민 반려애카드		연회비 8,000~13,000원	반려동물 업종 10%, 대형마트 5%, 인터넷쇼핑몰 5% 각각 할인	직전 1개월 합계 30만원 이상 사용시 혜택
	KB국민 펫코노미 카드		연회비 30,000원	동물병원 30%, 반려동물 업종 30% 할인 인터파크 PET 10% 청구 할인	
대구은행	DGB펫러브 카드		연회비 2,000~5,000원	동물병원 이용시 20% 청구 할인 반려동물 업종 (식품, 용품, 미용 등) 이용시 10% 청구 할인	
우리은행	위비할인 카드		연회비 10,000~12,000원	동물병원 이용 시 7% 청구 할인	

- 2013년 초 반려동물 등록제가 시행되면서 애완동물 관련 보험 상품까지 출시되었고 2009년 3,000여개의 동물전문병원은 2011년 3,200여개까지 늘었으며 동물병원도 점차 대형화·고급화 되어 가고 있는 실정이며, 반려동물이 삶의 동반자 혹은 가족과 같은 위치를 차지함에 따라 2020년에는 6조 원대에 이를 것으로 추산하고 있음.

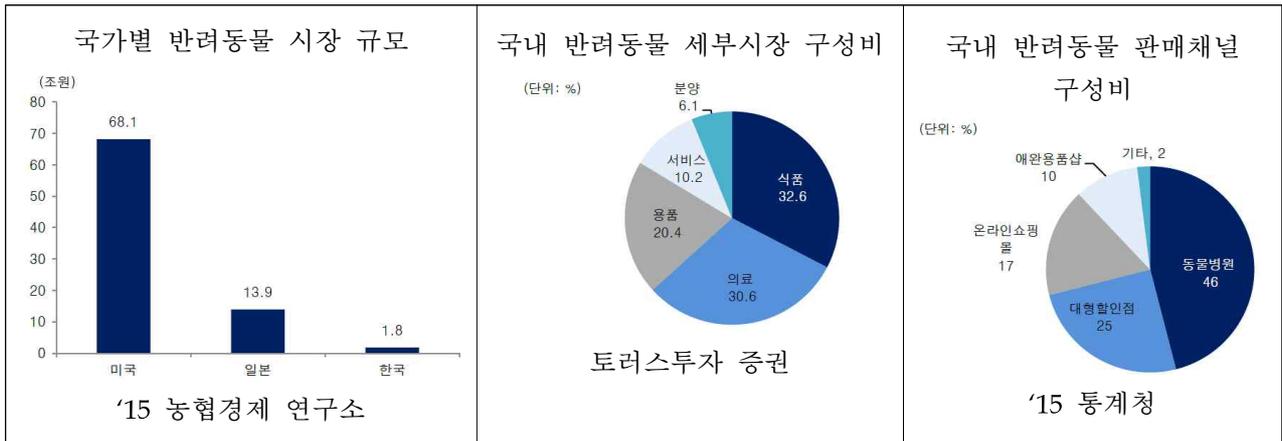
〈표. 주요 중국 손해보험사의 의료보험 특징 비교〉

보험회사	API 손해보험사	중국인민재산손해보험회사	중국평안손해보험회사
상품종류	반려동물 종합보험	반려동물 의료보험	반려동물 의료보험
보장범위	116종 질병	130종 질병	38-116종 질병
신체검사	보험료 납입 후 신체검사 실시, 신체검사 결과 합격 시 계약 발효		
반려묘 나이	만 8주-11세	만 18주-12세	만 8주-11세
반려견 나이	만 8주-9세	만 18주-12세	만 8주-9세
보장기간	1년		
보장금액한도	3만 위안	5천-5만 위안	1만-2만 위안
회당 보험금 지급한도	1만 위안	2천 위안	보장금액 한도의 90%
자기부담금	500위안 및 의료비의 20% 중 금액이 높은 것	300위안 및 의료비의 30% 중 금액이 높은 것	200위안 및 의료비의 10%
백신 접종	필요	필요	필요
비고	분실 시 광고비 지급	분실시 광고비 지급	없음
보험료	1,980위안	845-2,318위안	380-1,080위안

주: API 손해보험사가 판매하는 반려동물종합보험은 의료보험 및 책임보험을 포함하지만 여기서 의료보장 내용만을 소개함.

자료 : 각 보험회사 상품소개 및 기타 공개 자료를 바탕으로 정리함.

- 미국과 일본은 반려동물 산업 비중이 국내총생산(GDP)의 0.3% 수준으로 ‘15년 미국 68.1조원, 일본 13.9조원에 비해 한국은 0.1% 수준 (1.8조원)이라는 점을 감안하면 시장 확장 가능성이 크며 기존 예상 속도보다 더 빠르게 (5년 CAGR 33.9%) 반려동물 관련 시장이 급속이 확장되고 있는 상황임.



- 국내의 경우도 반려동물 시장 증대와 더불어 매년 동물의료 산업이 증대되고 있으며 2020년에는 현재의 5~6배 수준으로 증대될 것으로 예상되고 있는 상황에서 **반려동물 전용 한방 병원, 24시간 응급실, 스마트 병원 등의 새로운 형태의 병원**이 속속 등장하고 있는 환경에서 반려동물에 대한 양질의 의료서비스 제공 차원과 앞으로 성장할 시장 상황을 고려하여 동물세포치료제 개발이 필요함.
- 인간 세포치료제 개발함에 있어 중간단계로 비임상 시험을 실시하기 때문에 이미 잠재적으로 동물세포치료제 개발을 위한 기반은 확보되어 있다고 할 수 있으며, 동물세포치료제 개발이 성공한다면 줄기세포 관련 산업에 캐시 카우 역할을 할 것으로 사료됨.
- 연구 및 치료 목적의 동물유래 줄기세포 banking 상황은 농림축산검역본부에서 직접 추출 배양하여 banking화한 8종의 동물 60여개를 제외하고는 그 수가 정확히 파악된 바가 없으며 이 중 50%정도가 지방조직 유래 간엽줄기세포인 것으로 파악되고 있으며, 현재 농림축산검역본부에서는 banking화 되어 있는 세포들을 연구용으로 분양하고 있음. 하지만 치료를 목적으로 하는 세포의 banking 상황은 전혀 파악되지 않고 있음.
- 대학병원을 비롯하여 군소동물병원 및 연구소 등에서 일부 동물세포를 추출 및 배양하고 이를 banking하는 예가 제시되는 경우가 있는 것으로 비추어 보아 연구용 혹은 동물치료를 위한 목적으로 동결 보관중인 세포는 상당할 것으로 예상되고 있음.
- 반려동물 전문기업으로 알려진 모사의 경우 200건 이상의 줄기세포 치료를 실시하고 있다고 하며 관련 분야 매출이 증가하고 있다고 함.
- 최근 동물병원에서 **환축의 지방조직을 채취해 연구소로 송부하면 치료일정에 맞춰 분리 배양한 줄기세포를 배송하는 방식으로 운영하는 기업도** 속속 등장하고 있음.
- 동물유래 일차배양세포나 줄기세포를 이용하여 동물치료에 직접 이용하는 사례들이 속속

나타나고 있으며 미국과 유럽을 중심으로 동물치료에 줄기세포를 이용하는데 기업화하는 경향을 나타내고 있으나 아직은 국내외적으로 시장이 크지 않다고 판단되며 현재 시점에서는 사업화 초기 단계이며 초기 시장 형성기라고 할 수 있으나 2017년 동물세포치료제의 가이드라인이 발표되고 2018년 2월 관련 법안이 발표됨에 따라 시술자의 판단에 무게가 실리게 되어 시장 환경이 급격이 변하고 있는 상황임.

- 현재 많은 동물병원에서 줄기세포치료를 시술하고 있으며 시장에서는 이미 줄기세포 판매가 이루어지고 있으나 안전성에 대한 부분 역시 시술자의 판단에 따름.
- 학술자료에 의한 개의 조직으로부터 간엽줄기세포를 추출 및 배양한 예는 1997년 Kadiyala et al.이 Cell Transplant지에 발표한 것으로 골수에서 추출하여 배양하였고 주로 in vitro와 in vivo에서 뼈와 연골 분화 가능성을 확인 것임. 그 후로는 많은 논문들이 발표되고 있음. 다음 표는 개의 조직으로부터 간엽줄기세포를 추출 및 배양하여 분화능을 확인한 대표적인 논문들을 열거한 것임.

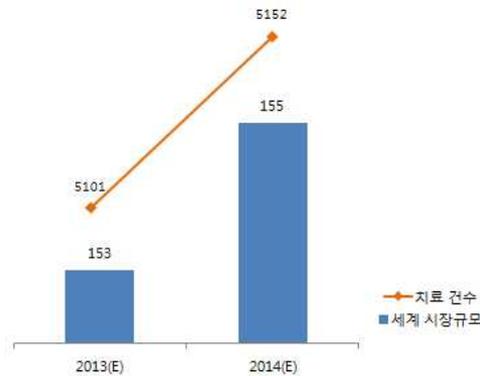
연도	세포형태	세포기원	참고문헌
1997	Mesenchymal stem cell	Bone marrow	Kadiyala, S., R. G. Young, et al. (1997). "Culture expanded canine mesenchymal stem cells possess osteochondrogenic potential in vivo and in vitro." Cell Transplant 6(2): 125-134.
2005	Mesenchymal stem cell	Bone marrow	Volk, S. W., D. L. Diefenderfer, et al. (2005). "Effects of osteogenic inducers on cultures of canine mesenchymal stem cells." Am J Vet Res 66(10): 1729-1737.
2006	Embryonic stem-like cell	Blastocysts	Hatoya, S., R. Torii, et al. (2006). "Isolation and characterization of embryonic stem-like cells from canine blastocysts." Mol Reprod Dev 73(3): 298-305.
2008	Mesenchymal stem cell	Adipose tissue	Neupane, M., C. C. Chang, et al. (2008). "Isolation and characterization of canine adipose-derived mesenchymal stem cells." Tissue Eng Part A 14(6): 1007-1015.
2009	Mesenchymal stem cell	Fetal blood(cord blood)	Seo, M. S., Y. H. Jeong, et al. (2009). "Isolation and characterization of canine umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells." J Vet Sci 10(3): 181-187.
	Embryonic stem-like cell	Embryo	Wilcox, J. T., E. Semple, et al. (2009). "Characterization of canine embryonic stem cell lines derived from different niche microenvironments." Stem Cells Dev 18(8): 1167-1178.
	Embryonic stem-like cell	Embryo	Vaags, A. K., S. Rosic-Kablar, et al. (2009). "Derivation and characterization of canine embryonic stem cell lines with in vitro and in vivo differentiation potential." Stem Cells 27(2): 329-340.
2010	Mesenchymal stem cell	Adipose tissue	Vieira, N. M., V. Brandalise, et al. (2010). "Isolation, characterization, and differentiation potential of canine adipose-derived stem cells." Cell Transplant 19(3): 279-289.
2011	Induced pluripotent stem cells	Fibroblast	Piedrahita, J. A., S. Koh, et al. (2011). "Generation and Characterisation of induced pluripotent stem cells (iPSCs) from adult fibroblasts." Reprod Fertil Dev 24(1): 285.
	Mesenchymal stem cell	Fetal adnexa	Filioli Uranio, M., L. Valentini, et al. (2011). "Isolation, proliferation, cytogenetic, and molecular characterization and in vitro differentiation potency of canine stem cells from foetal adnexa: a comparative study of amniotic fluid, amnion, and umbilical cord matrix." Mol Reprod Dev 78(5): 361-373.

2013	UF-dependent induoed pluripotent stem cells	Dermal fibroblast	Whitworth, D. J., D. A. Ovchinnikov, et al. (2012). "Generation and Characterization of LIF-dependent Canine Induced Pluripotent Stem Cells from Adult Dermal Fibroblasts." Stem Cells Dev.
2018	Allogenic Mesenchymal stem cell	Adipose tissue	Antonio José Villatoro et al. (2018) "Allogeneic adipose-derived mesenchymal stem cell therapy in dogs with refractory atopc dermatitis: clinical efficacy and safety"
2018	Mesencymal stem cell	Bone Marrow	Lauren K.Dobson et al. (2018) "Canine Mesenchymal Stem Cell-Mediated Bone Regeneration is Enhanced in the Presence of Sub-Therapeutic Concentrations of Rhbmp-2 in a Murine Critical-Sized Calvarial Defect"

- 노령견에서는 특히 골관절염, 골다공증 등 뼈와 관련한 질환이 다발하는데, 그 치료법이 소염진통제나 면역억제제 등에 국한되어 있는 실정임.

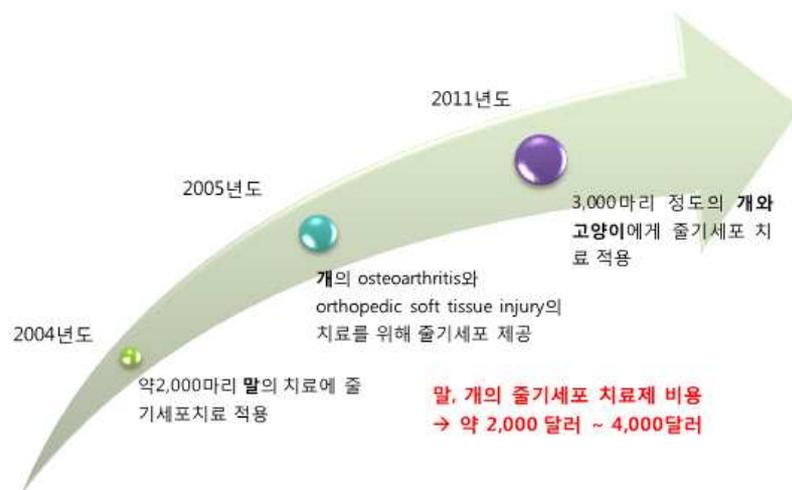
<세계 반려견용 골세포치료제 시장규모>

(단위: 억원)



자료 : VET-Stem Co.과 2013년 세계 동물보건 산업 시장 리뷰, IFAH, 2014, APPA (Animal Pet Products Association)

- 동물용 줄기세포 치료제 적용 현황 : 줄기세포 치료제 비용은 평균적으로 약 2,000달러 ~ 4,000달러로 적용되고 있음.



출처 : journal of Korean Veterinary Medical Association

- 세계 반려견용 골세포치료제 시장은 2020년에 약 1,258억원 규모로 연평균 129% 성장하여 2024년도에는 약 3조 4,585억원, 국내 시장은 2020년 약 20억원 규모에서 **매년 118% 성장률**로 2024년에는 약 450억원의 규모로 시장이 형성될 것으로 전망됨.

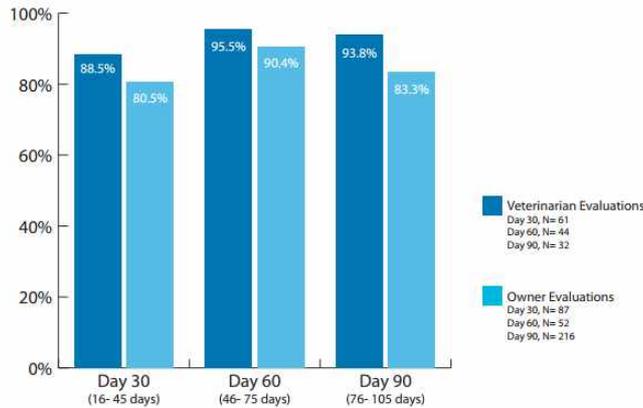
<표> 국내외 반려견용 골세포치료제 시장 규모 전망

(단위: 억원)

구분	2020	2021	2022	2023	2024	CAGR
해외 시장	1,258	2,515	5,534	13,834	34,585	129%
국내 시장	20	30	60	150	450	118%
합계	1,278	2,545	5,594	13,984	35,035	128.8%

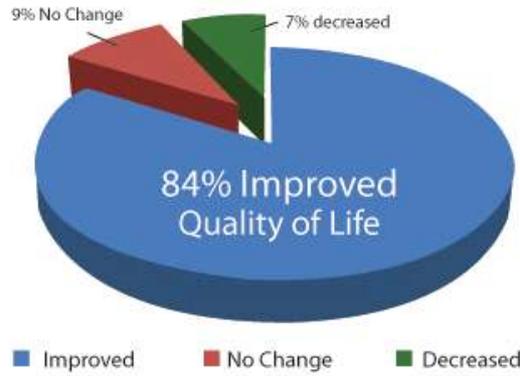
자료 : VET-Stem Co.과 2013년 세계 동물보건 산업 시장 리뷰, IFAH, 2014, APPA (Animal Pet Products Association)

- 국외에서는 이미 동물에 대한 세포치료를 전문으로 하는 기업이 설립되어 있으며, 그 중 대표 격이라 할 수 있는 미국의 Vet-Stem사는 이미 개, 고양이, 말 등에 대한 세포치료를 수의사와 연계하여 수행하고 있음. 특히, 지방조직으로부터 세포를 추출하여 말에 투여 혹은 처치를 통하여 치료하는 연간 4,140마리에 이르며 치료 성공률은 80%이상이라고 하며 그 효과가 빠르게 나타난다는 장점이 있다고 함.



<정형외과에서 개의 삶의 질 향상을 위한 줄기세포 치료 현황, 출처 Vet-Stem Co.>

- 수의과 (정형외과)에서 30, 60, 90일 줄기세포 치료제를 적용한 결과, 80% 이상의 개는 삶의 질이 향상됨을 확인하였고 반려견의 소유자로부터 반려견의 삶의 질 조사를 실시한 결과는 줄기세포 치료를 받은 반려동물의 84%는 삶의 질이 향상되었으며 이중 78%는 1년 이내에 반복치료를 하지 않은 것으로 보고 됨.



< 관절염을 치료하기 위한 줄기세포 치료제 적용 삶의 질 조사 >

- 유럽에서는 FAT-Stem사가 대표적으로 많은 제품군을 출시하였는데, 재생 의학 분야의 새로운 발전에 따라 개, 말과 기타 동물에 세포 치료법을 제공하고 있음.

<FAT-Stem사 제공>

제품명	특징	
Plate-Stem [®]	인대, 힘줄 부상을 위한 솔루션 키트	<ul style="list-style-type: none"> • 환자 자신의 지방 조직에서 Fat-Stem에 의해 제조된 자가 중간엽 줄기세포가 포함되어 있음 • 지방 조직검사 및 혈액 샘플은 전용 택배 서비스에 의해 특별히 개발된 키트가 Fat-Stem에 전달되어짐 • 10-14일 후, 수의사는 환자에게 주사 2병을 주입함 • 만성 인대 손상이 있는 말의 치료를 위해 12개월 이상 후속 조치를 취해왔으며, 100마리 이상의 말에 평가받고 있음 • 환자 자신의 지방조직에서 Fat-Stem에 의해 제조된 성장인자 및 중간엽 줄기세포가 포함되어 있음. 성장인자는 치유과정을 향상시키는 줄기세포를 자극함
Chondro-Stem [®]	말 관절의 연골 결함을 위한 줄기세포 키트	<ul style="list-style-type: none"> • 지방조직 등으로부터 유도된 줄기세포 생성물임 • 연골세포 외 매트릭스는 차별화된 것으로 말의 퇴행성 골관절염에게 사용됨
Top-Stem [®]	활성화 줄기세포의 단일 용량 회생 제품	<ul style="list-style-type: none"> • 말의 몸을 건강하게하고, 동물의 면역 체계 향상 및 에너지와 스포츠 레벨을 향상시키기 위한 긍정적인 신호를 제공함 • 심근경색, 관절염 및 류머티즘, 근육 질환 같은 노화 징후의 원인을 개선함 • 또한, 조직과 세포(예, 소화기관 및 피부)의 재생과 조절 줄기세포의 라이프 사이클을 연장하기 위해 사용
Dog-Stem [®]	개의 골관절염 치료 위한	<ul style="list-style-type: none"> • 개의 관절염은 만성통증, 경직, 보행 장애와 염증 및 연골 변성에 의해 나타남

제품명	특징	
	줄기세포 제품	<ul style="list-style-type: none"> • 개에게 통증을 완화시키면서 재생 치료를 제공
Allo-Stem [®] frost	<u>동종 냉동</u> <u>줄기세포</u>	<ul style="list-style-type: none"> • 말의 힘줄과 인대 문제를 치료 • 진단에 즉시 사용 가능(-196°C에서 저장) • 효율적인 비용 • 말의 지방 조직검사에 대한 필요가 없음
Arti-Stem [®] frost	<u>말의 지방 유래</u> <u>줄기세포로부터</u> <u>파생됨</u>	<ul style="list-style-type: none"> • 말의 골관절염에 대한 새로운 관절 치료 • 진단에 즉시 사용 가능(-196°C에서 저장) • 효율적인 비용 • Cytokines의 활성화 분비를 통해 조직 치료를 촉진

- 국내에서는 일부 동물병원에서 개별적으로 Stromal Vascular Fraction (SVF)나 Platelet-Rich Plasma(PRP)를 활용한 치료법을 적용하는 것으로 알려져 있으나 해외사례에서와 같이 **표준화된 제품 개발 및 적용 프로토콜 정립이 필요함**.
- 시장이 아직은 도입 초기단계이고 관련 규제가 미비한 현재 시점이 해외에 대한 기술 대응력 향상과 국내 기술 확보 등을 위해서라도 본격적으로 연구개발을 시작할 시점이라고 생각함.
- 동물 적용 줄기세포에 대한 연구는 반려동물의 치료용뿐만 아니라 멸종위기 동물의 유전자원 보존을 위해서도 적용가능하며, 그 연구개발에는 인체적용을 위한 경우와 유사한 정도로 시간이 걸리지만, **승인 및 허가 등의 부분이 간단하거나 까다롭지 않아 세포치료제로서 시판되는데 까지 걸리는 시간이 적게 걸리는 장점이 있음**.
- 현재 국내·외적으로 관련 가이드라인이나 규제가 미비하여 장기적으로 봤을 때는 시장 확장뿐만 아니라 문제 발생 시 해결할 수 있는 기준이 없어 사실상 자의적으로 해석하는 방법밖에 없으며, 국내에도 허가받은 동물의약품이 없고 관련 규제 등이 없지만, 허가받은 제품이 없어 실질적으로 규제 밖에 있다고 할 수 있다고 함.
- 안전하고 우수한 동물용 의약품 공급을 위한 과학적이며 효율적인 동물용 의약품의 품질규격을 마련하고자 동물용의약품 안전성·유효성 심사를 실시하는데 그 근거는 다음과 같으며,
 - 1) 「동물용의약품등취급규칙」 제50조(동물약사감시원)
 - 2) 동물약사감시요령(농식품부 훈령 제116호)
 - 3) 동물용의약품등 안전성·유효성 심사에 관한 규정(농림축산검역본부 고시 제2011-13호)
 - 4) 동물용의약품등 제조허가 및 품목허가등 지침(농림축산검역본부 고시 제2011-18호)
 또한, 국내 유통 동물의약품 품질관리·향상으로 축산업 발전에 기여하고자 국가검정을 실시하고 있음.
 - 1) 「약사법」 제53조(동물용의약품의 국가검정)
 - 2) 「동물용의약품등 취급규칙」 제4장 동물용의약품의 국가검정
 - 3) 「국가검정 동물용의약품 검정기준」 (농림축산검역본부고시 제2011-4호)
- 미국의 경우는 FDA에서 동물 재생 제품 이상 기본 및 독점 규제 관할권을 시행(FDA's Regulation of Veterinary Regenerative Medicine: What Industry Needs to Know to Market and Sell a Stem Cell Product for Use in Dogs, Cats, Horses and other Animals)

하고 있으며, 애완동물을 위한 대부분의 치료는 인간을 위한 치료와 같은 방법으로 규제하고 있음.

- 반려동물을 위한 대부분의 치료는 인간을 위한 치료와 같은 방법으로 규제하고 있기는 하나 FDA 및 USDA와 같은 규제 기관에서 동물의약품이 우선순위가 낮고 적은 자원으로 치료제 연구를 하고 있기 때문에 인간 의약품에 비해서는 규제가 뒤떨어져 있음.
- FDA는 동물치료 시 수의사가 엄격한 규정(FDA Might Regulate Stem-Cell Therapies for Dogs & Cats: But Probably Not)에 의해 치료를 제공하도록 하고 있으며, 연방 식품, 의약품, 화장품 법에 의해 위임 된 바와 같이, 새로운 동물 약물은 매매를 할 수 없으며, 임상 시험용 동물용 의약품은 미국 FDA에 의해 약물로 간주되어 동물용 의약품 제조 시설은 미국 FDA 의약품 등록 및 목록의 요구 사항이 적용되고 있음.
- 본 반려견을 위한 세포치료제 개발 “골세포치료제”는 농림축산검역본부의 도움을 받아 정도관리 및 유효성 평가를 실시함으로써 앞으로 개발될 많은 동물용 세포치료제의 예가 될 것으로 예상됨.
- 앞으로 동물의약품 시장에서 세포치료제라는 새로운 분야를 개척하는데 많은 도움을 줄 것이며 더불어 동물세포 치료제 개발과 유효성과 안정성 시험에 대한 방향을 제시해 줄 것으로 기대됨

1-3. 연구개발 범위

연구 범위	연구수행방법 (이론적·실험적 접근방법)	구체적인 내용
목적동물 임상용 세포확보 및 동물의약품 제작	<ul style="list-style-type: none"> • 이력이 확실한 동물로부터 조직 확보 및 의약품용 세포 확립 및 보관 프로토콜 마련 	<ul style="list-style-type: none"> • 원료세포 확보를 위한 시설 및 설비 완료 : Class 10,000이하의 세포배양 시설 마련과 장비 Validation 수행하였음 (2017년 6월 완공) • 반려견의 조직으로부터 골세포치료제 개발을 위한 세포자원을 확보하기 위해 둔부, 두부, 복부 등의 조직을 확보하여 세포를 추출 배양하고 세포치료제용 세포를 선정함 • 세포 특성 및 분화능 분석하고 관련 SOP마련
골세포치료제 개발 프로토콜 마련	<ul style="list-style-type: none"> • 3차원 분화방식 적용 지방유래 줄기세포의 골분화 	<ul style="list-style-type: none"> • 세포분화 프로토콜을 최종적으로 확보하고 SOP를 마련함 • 개과 동물의 골조직 재생용 세포치료제에 대한 특허 출원 완료 10-2018-0126642

<p>in vivo 안전성 평가</p>	<ul style="list-style-type: none"> 세포치료제에 대한 in vivo 안전성 평가 실시 및 허가용 파일링 	<ul style="list-style-type: none"> 종양원성, 투여 독성, 장기독성, 분포 시험을 실시 완료 - 종양원성, 장기독성 결과 확보 - 투여독성 결과 확보. - 분포시험의 경우 4주, 12주 분포시험 진행, 각 주요 장기를 확보하여 진행 제조지시서 확보 동물세포치료제 기시법 마련 동물세포치료제 규격서 마련
<p>개에서 세포치료제의 생체내 전달기법 확립 및 검증 (제1협동)</p>	<ul style="list-style-type: none"> 전임상 질환모델 전달기법 표준화 	<ul style="list-style-type: none"> 질환모델 제작, 수술 처치, 임상적 평가, 실험 종료 후 평가 등 세포-지지체 복합체 생체 내 이식 평가 방법 SOP 확립 대구경북첨단의료산업진흥재단 실험동물센터와 연계하여 국제기준의 평가기법 표준화
<p>임상적용후보 세포-생체 내 유효성 평가 (제2협동)</p>	<ul style="list-style-type: none"> 1차년도에서 선정한 세포치료제의 적응증 확대를 위해 long bone 재생 모델인 rat radial segmental defect 모델을 확립함. 반려견 지방줄기세포의 골재생 유효성을 확립된 5-mm rat radial defect model에서 수행함. Rat의 좌측 radius에 길이 5-mm segmental defect를 만들고 fibrin glue와 함께 고정된 2×10^6 의 세포치료제 후보군을 이식함. 수술 12주후 쥐를 sacrifice하고 수술환부를 적출하여 X-ray 및 μCT 분석을 수행하여 골재생 유효성을 평가하였음. 	<ul style="list-style-type: none"> 실험동물의 그룹은 G1(Fibrin only), G2(미분화 세포), G3(3차원 분화유도세포), 그리고 G4(분화 및 미분화 1:1 혼합세포) 였음. 각 그룹 당 동물 수는 5마리씩이며 수술환부 특성상 개체운동량에 의해 환부가 영향 받지 않도록 좌측 radius에만 수술했으므로 n수는 5임. 처리된 세포그룹의 선정은 1차년도 대비 수술환부가 다르므로 1차년도와 동일하게 그룹을 선정함. 선행된 In vivo 모니터링 결과에서 이식된 세포의 형광도가 이식 후 4주내에 모두 소멸한 관계로 4주 동안만 면역억제제를 처리함. Rat radius segmental defect 유효성 시험결과 반려견 지방간엽줄기세포는 1차년도 calvarial defect 모델에서의 결과와 마찬가지로 X-ray 및 μCT 분석을 통해 세포 혼합그룹인 G4 보다는 분화유도세포만을 이식한 G3 그룹에서 더 우수한 골재생 효능을 보임을 확인하였음.

<p>생체 내(In Vivo) 생물학적 활성 평가 및 모니터링 (제2협동)</p>	<ul style="list-style-type: none"> • 최종 세포치료제 후보가 단일분화세포군으로 선정됨에 따라 이식세포 생체 모니터링 시스템을 바이러스 시스템에서 형광나노입자 방식으로 변경함. • 주관연구기관에서 제조한 q-dot 기반의 적색형광 나노입자를 1 x 10⁵ 줄기세포 당 10 ug 처리하여 3-D 분화유도 전에 표지함. • 형광 표지된 세포치료제 후보를 상기에서 확립된 rat radius segmental defect에 이식하고 in vivo 이미징 장치로 형광을 주기적으로 분석함. • 형광이 더 이상 검출되지 않으면 이미징 관찰과 면역억제제 처리를 멈추고 최종 12주후에 골재생 정도를 확인함. 	<ul style="list-style-type: none"> • 2 x 10⁶ 형광 표지된 줄기세포를 환부에 이식하고 2-3일 간격으로 적색형광 강도의 변화를 IVIS in vivo imaging system으로 관찰하였음. • 이식된 세포의 형광시그널은 수술 후 2일째부터 나타나기 시작하고 이식 후 6일차에 가장 강한 형광이 확인되며 28일차 이후에는 대체로 형광이 확인되지 않았음. • 수술 시 세포가 골고루 분포되어 있는 fibrin-thrombin gel을 이식하였음에도 불구하고 시간이 지남에 따라 세포가 절단골 양 끝으로 이동하는 것으로 확인됨. • 28일 이후에는 형광이 검출되지 않으므로 세포 이식 28일 이후에 발생하는 골재생 효과는 세포가 분비한 골 재생 물질에 의한 paracrine effect에 의한 것임을 확인함. • 28일 이후 면역억제제 처리를 중단하였으나 X-ray 및 μCT 분석 결과, 이것이 최종 골재생 효과에 영향을 미치지 않는 것으로 확인됨. • 관련 결과는 1세부와 함께 논문 준비중에 있음.
<p>반려견 골세포치료제 평가방법 (제3협동)</p>	<ul style="list-style-type: none"> • 골세포치료제 평가 가이드라인 작성 	<p>골세포치료제 평가 가이드라인 작성 (별첨)</p>

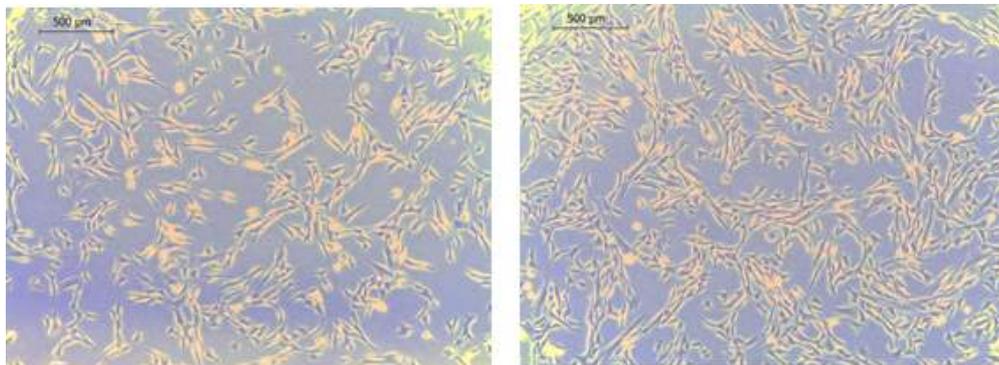
2. 연구수행 내용 및 결과

○ 제1세부 : (주)세포바이오

1. 세포치료제용 세포 원료 확보

관리번호	Lot. No	Stock day	Stock vial	Mycoplasma	비고
CB-cADMSC-003	50O12-003	2015.01.12	79	Negative	Using each medium at primary culture time
	50O09-003	2015.01.09	63	Negative	
	50O10-002	2015.01.10	166	Negative	
CB-cADMSC-004	50E23-004	2015.11.23	168	Negative	3y, F
CB-cADMSC-005	60M23-005	2016.05.23	12	Negative	5.7kg, 8y, F
CB-cADMSC-006	60M30-006	2016.05.30	21	Negative	2.05kg, 1.8y, F
CB-cADMSC-007	60M30-007	2016.05.30	20	Negative	2.6kg, 5.8y, F
CB-cADMSC-009	60J17-009	2016.06.17	18	Negative	2.4kg, F
CB-cADMSC-011	60U12-011	2016.08.12	3	Negative	3.7kg, 10y, M
CB-cADMSC-012	70A21-012	2017.04.21	160	Negative	3y, F

- 2015년과 2017년에 확보된 조직으로부터 세포를 추출 배양하여 2015년 11월 23일에 168 바이알 banking 한 MCB와 2017년 4월 21일 약 100vial banking 한 MCB를 현재 세포치료제용으로 적용



<세포 형태 확인 Day 2와 Day 3>

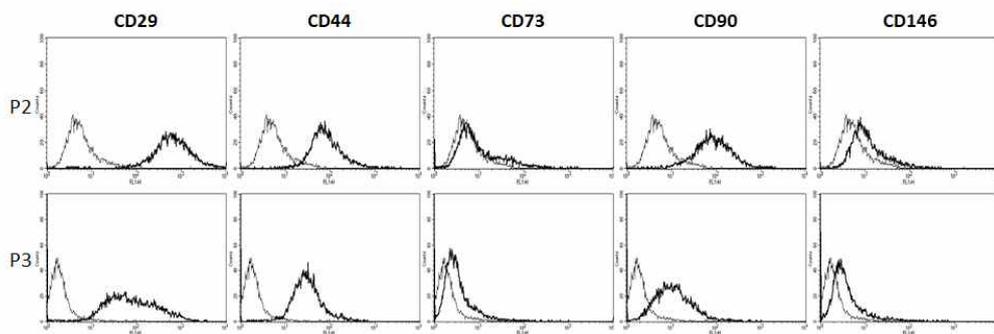
- 2015년 11월에 확보한 조직의 경우는 세포치료제 관련 SOP 및 기시법을 확보하는데 적용

2. Canine 조직의 virus check

CanineVirus	항체명	Cat.#	Company
디스토펜 바이러스	CDV Ag	RG11-03	바이오노트
코로나 바이러스	CCV Ag	RG11-04	바이오노트
파보바이러스	CPV Ag	RG11-01	바이오노트

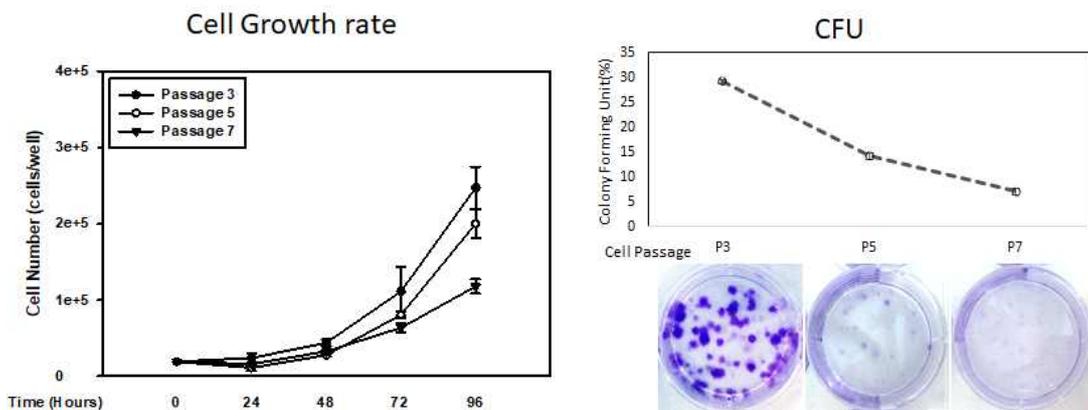
Canine조직의 세포추출 및 일차배양 시 초기에 바이러스 감염여부를 확인하기 위해 검역본부의 자문을 받아 3종류의 바이러스를 선별하고 이를 확인하여 바이러스가 감염되지 않음을 확인함

3. 원료세포 특성분석



<세포 표면 단백질 분석>

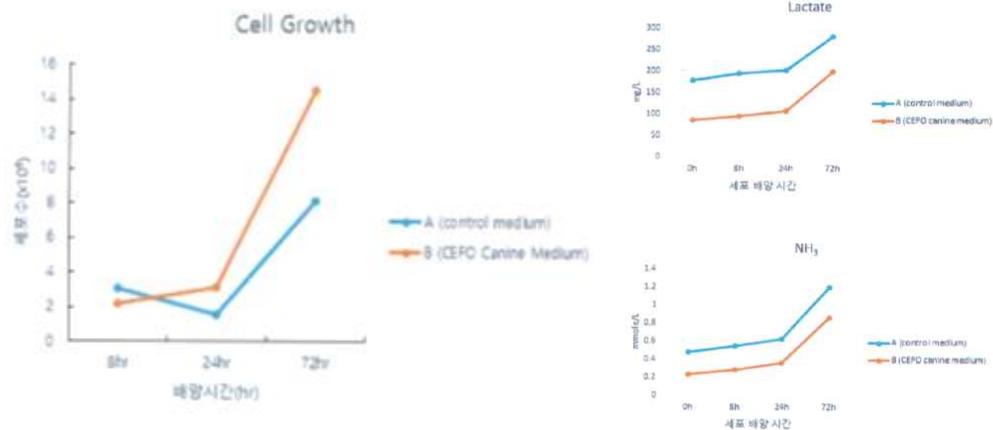
세포표면 단백질 분석결과 CD29(양성), CD44(양성), CD73(낮은 수준 발현), CD90(양성), CD146(낮은 수준 발현)의 특징을 나타내었다.



구축된 세포의 계대배양 횟수별 성장 그래프와 Colonizing Forming Unit을 확인한 결과 Passage 3에서는 세포 확장성이 매우 좋은 것으로 확인되었으나 passage 5에서는 CFU가 50% 정도인 것으로 확인되었고 Passage 7에서는 세포의 성장과 확장성이 급격히 저하되는 것을 확인 할 수 있었다. 따라서, 본 세포는 세포치료제 적용 시 Passage 5이하에서 사용하는 것이 적절한 것으로 예상되었다.

개발된 배지의 경우 객관적 평가를 위하여 생산기술연구원에 배지 성능 평가를 의뢰하였으며, 그 결과 자체적으로 개발한 배지가 세포 성장률에서 좋은 성적을 보였으며 암모니아나

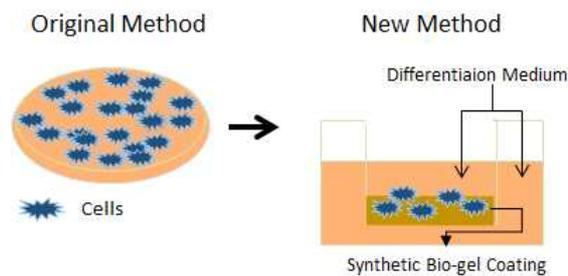
lactate와 같은 배양에 의해 발생하는 대사물의 생성이 낮은 것으로 나타났다. 암모니아나 lactate는 배지 교환 시기를 알려주는 알람과 같은 역할을 하지만 그 발생량이 높을 경우 세포의 성장을 저해하는 등의 영향을 끼치기 때문에 배지 교환시기가 더 빨라져야 한다. 따라서 신규 개발된 배지는 암모니아나 lactate의 양이 느리게 증가하고 성장은 우수한 것으로 보아 더 좋은 배지로 판정되었다.



<세포성장을 및 대사산물 그래프>

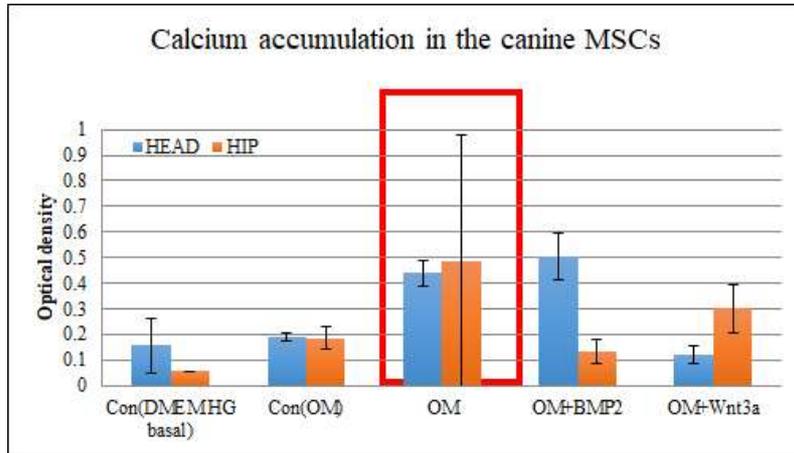
4. 세포치료제 개발

4.1 골분화 유도

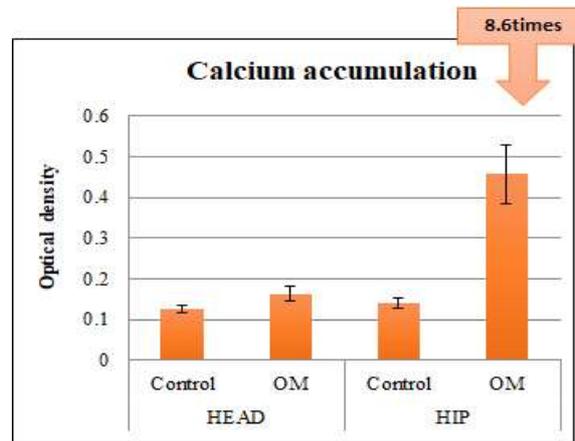


<세포배양 및 분화 유도 방법>

- 기존의 2차원 방식이 아닌 합성 하이드로겔을 이용한 3차원 세포배양과 분화 방식의 적용으로 빠른 초기 골분화 유도



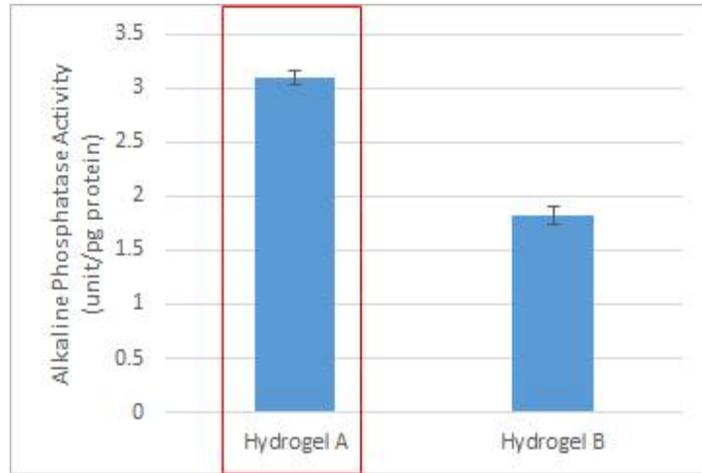
- 다양한 방법으로 지방조직유래 간엽줄기세포를 분화 유도하여 칼슘 축적을 확인한 결과 3차원 방법을 적용한 경우 가장 분화유도가 잘 되는 것으로 확인할 수 있었다.



<지방세포 추출 위치에 따른 골분화 정도 확인>

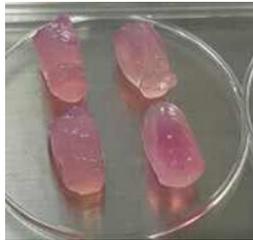
- 머리 쪽 조직에서 확보한 지방조직 유래 간엽줄기세포와 둔부 쪽 조직에서 확보한 지방조직 유래 간엽줄기세포의 골분화 정도를 비교한 결과 같은 기간 내 칼슘침착 정도는 둔부 지방조직 유래 간엽줄기세포가 더 우수하였다. 따라서, 지방조직유래 간엽줄기세포를 이용하여 골세포치료제를 개발하는 경우 둔부 지방조직유래 간엽줄기세포를 이용하는 것이 더 유리하다는 것을 알 수 있었다.

4.2 하이드로겔의 종류에 따른 골분화 유도



세포치료제 생산에 필요한 조건을 확립하기 위하여 하이드로겔 종류에 따른 분화 정도를 비교하여 골분화에 적합한 하이드로겔을 선정하였다.

5. 세포치료제 이식을 위한 캡슐화 조건 확립



스캐폴드와 치료제용 세포를 혼합하여 제작
캡슐 크기 2.5 X 2.5 X 8mm

<캡슐화된 이식 직전의 세포치료제>

목적동물에 이식하기 위해 defect부분의 크기를 측정하여 3D프린터로 몰드를 작성한 후 세포를 겔과 혼합하여 몰드에 채운 후 겔화시켜 캡슐화 하여 이식용 캡슐을 마련하였음.

6. 장기독성 시험 : 간장, 심장, 허파, 지라, 콩팥에 대하여 장기독성 시험 실시 (이식된 세포에 의한 독성 평가)

Group		No. of animals	Slide Identification
Group 1 (G1)	Vehicle	4	G1-1~G1-4
Group 2 (G2)	미분화세포 이식	5	G2-1~G2-4
Group 3 (G3)	분화세포 이식	4	G3-2~G3-5
Group 4 (G4)	미분화세포+분화세포 (1:1)이식	4	G4-1~G4-4
Total		17	

심장 : 독성이 있다고 의심되는 소견 없음

간장 : 단핵구 침윤소가 관찰되기는 하나 정상팻트에서도 자주 발견되는 소견이며 실험군간 차이가 관찰되지 않아 시험물질에 의한 독성은 없는 것으로 판단.

폐장 : 단핵구 침윤과 동맥벽 비후가 관찰되었으나 실험물질과 무관하게 비특이적으로 발생한 것임.

지라(비장) : 모든 실험군의 모든 개체에서 유의할 만한 이상소견 없음.

콩팥(신장) : 국소성 신증과 림프구 침윤이 발견되기는 하나 정상외의 경우에도 자주

발견되는 소견으로 세포 투여와는 무관한 것으로 판단.

Groups	Group 1 (G1)	Group 2 (G2)	Group 3 (G3)	Group 4 (G4)
Treatment	Vehicle	미분화세포 이식	분화세포 이식	미분화와 분화세포 혼합
No. examined	4	5	4	4
Heart				
No specific lesion	3(75.0)	5(100.0)	4(100.0)	4(100.0)
Myopathy, (multi)focal	1(25.0)	0(0.00)	0(0.00)	0
Grades: mild	1		0	0
Liver				
No specific lesion	4(100.0)	4(80.0)	4(100.0)	4(100.0)
Cell infiltration, mononuclear cells, (multi)focal	0(0.00)	1(20.0)	0(0.00)	0(0.00)
Grades: minimal		1		
Lung				
No specific lesion	2(50.0)	2(40.0)	1(25.0)	2(50.0)
Mononuclear cell infiltration, perivascular, (multi)focal	2(50.0)	3(60.0)	3(75.0)	2(50.0)
Grades: minimal	2	3	3	1
mild	0	0	0	1
Arterial medial hypertrophy	0(0.00)	0(0.00)	0(0.00)	1(25.0)
Grades: moderate	0	0	0	1
Spleen				
No specific lesion	4(100.0)	5(100.0)	4(100.0)	4(100.0)
Kidney				
No specific lesion	2(50.0)	2(40.0)	2(50.0)	1(25.0)
Tubular degeneration/regeneration, multifocal	2(50.0)	2(40.0)	1(25.0)	2(50.0)
Grades: minimal	1	1	0	2
mild	1	1	1	0
Hyaline casts, (multi)focal	2(50.0)	3(60.0)	2(50.0)	3(75.0)
Grades: minimal	1	2	1	2
mild	1	1	1	1
Focal nephropathy	1(25.0)	1(20.0)	2(50.0)	0(0.00)
Grades: minimal	1	1	1	0
mild	0	0	1	0
Glomerulonephropathy, multifocal	1(25.0)	0(0.00)	1(25.0)	0(0.00)
Grades: minimal	1	0	1	0

<Histology 요약>

조직병리검사결과보고서

의뢰자: ㈜세포바이오, 이종민 선생님

검경책임자: 강원대학교 수의과대학 윤병일 교수

D.V.M., Ph.D., KCVP, Tox. Pathologist

보고서 작성책임자 서명:


 윤병일 교수 _____ 2017. 3. 18
D.V.M., Ph.D., KCVP, Tox. Pathologist *Date*

Group	Group 1 (G1)				Group 2 (G2)					Group 3 (G3)				Group 4 (G4)			
	Vehicle				미분화세포 이식					분화세포 이식				미분화와 분화세포 혼합			
Dose	1	2	3	4	1	2	3	4	5	2	3	4	5	1	2	3	4
Animal ID	1	2	3	4	1	2	3	4	5	2	3	4	5	1	2	3	4
Heart		NSL	NSL	NSL	NSL	NSL	NSL	NSL	NSL	NSL	NSL	NSL	NSL	NSL	NSL	NSL	NSL
Myopathy, (multi)focal		2+															
Liver	NSL	NSL	NSL	NSL	NSL	NSL	NSL	NSL		NSL	NSL	NSL	NSL	NSL	NSL	NSL	NSL
Cell infiltration, mononuclear cells, (multi)focal									1+								
Lung	NSL	NSL				NSL			NSL		NSL			NSL		NSL	
Mononuclear cell infiltration, perivascular, (multi)focal			1+	1+	1+		1+	1+		1+		1+	1+		2+		1+
Arterial medial hypertrophy																	
Spleen	NSL	NSL	NSL	NSL	NSL	NSL	NSL	NSL	NSL	NSL	NSL	NSL	NSL	NSL	NSL	NSL	NSL
Kidney		NSL	NSL		NSL		NSL	NSL			NSL	NSL	NSL		NSL		
Tubular degeneration/regeneration, multifocal	2+			1+			2+		1+		2+			1+			1+
Hyaline casts, (multi)focal		2+		1+		1+	2+		1+	1+	1+					1+	2+
Focal nephropathy		1+					1+			1+	2+						
Glomerulonephropathy, multifocal		1+									1+						

NSL, no specific lesion
 Grades; 1+, minimal; 2+, mild; 3+, moderate; 4+, severe

〈조직별 Histology 요약〉

7. in vivo 안전성 조건

7.1 종양원성

7.1.1 동물 조건

종 및 계통		의뢰자로부터 제공받은 nude 랫드	
성별		수컷	암컷
수량	투여시	10	
	부검시	22	

7.1.2 시험군 조건

군	성별	동물수	동물번호	투여량(cells/head)
G1	M / F	5 / 5	1-5 / 19-23	0
G2	M / F	3 / 3	6-8 / 24-26	1.0×10^5
G3	M / F	5 / 5	9-13 / 27-31	1.0×10^5
G4	M / F	5 / 5	14-18 / 32-36	1.0×10^5

G1-G4: 골결손 유발(left radius region) 및 유발 후 2 주차까지는 면역억제제(Cyclosporin A) 10mg/kg/head 투여, 2주이후 ~ 3주차 5mg/kg/head 투여함.

G1: 음성대조군(Fibrin-thrombin gel 이식).

G2: 양성대조군(Canine osteosarcoma cells + Fibrin-thrombin gel)

G3: 시험물질투여군 (Canine 세포 이식군: Canine ADMSCs + Fibrin-thrombin gel 이식)

G4: 시험물질투여군 (Equine 세포 이식군: Equine UC-Mscs + Fibrin-thrombin gel 이식)

- 음성대조군 암컷 # 23 및 양성대조군 암컷 # 24은 폐사동물로서 의뢰자측에서 부검시 적출된 장기들이 포르말린용액에 보존되어 전달되었다.

Positive control : OSA Cell line(canine Osteosarcoma)

투여부위 3개월 (Local Injection)

7.1.3 부검 소견

부검소견(Table 4; Appendix 1-4)

신우확장(dilation of renal pelvis)이 음성대조군 수컷에서 1례가 관찰되었고, 우측후지 부종(edema, right pelvic limb)이 Equine 세포이식군에서 1례가 관찰되었고, 자궁내 맑은액체 저류(retention of clear fluid)가 음성대조군 및 Canine 세포 이식군에서 각 1례가 관찰되었다. 간 중간엽 융기(protuberance of median lobe) 및 비장의 이분엽(divided into two parts)이 Equine 세포 이식군에서만 각 1례가 관찰되었고, 좌측 전지의 결절(nodule, left thoracic limb)은 암컷 양성대조군에서만 2례가 관찰되었다.

계획부검 동물에서 부검소견에 부합하는 조직병리학적 소견은 Text Table-1과 같다.

Organ	Gross finding	Group/sex-animal number	Histopathologic findings
Kidney	신우확장 (dilation, renal pelvis)	G1/male-5	Dilation, pelvis, kidney
Uterus	맑은 액체 저류(Retention of clear fluid)	G1/female-22 G3/female-28	Dilation, lumen, uterus
Left thoracic limb	결절(nodule)	G2/female-25, 26	Osteosarcoma
Right pelvic limb	부었음(Swelling)	G4/female-33	Mixed cell inflammation
Liver	중간엽 융기(protuberance, median lobe)	G4/female-33	Hepatodiaphragmatic nodule
Spleen	이분엽(divided lobe into 2 parts)	G4/female-34	Deformity

7.1.4 고찰 및 결론

본 시험은 골결손 치료용 세포치료제로 개발중인 Canine ADMSCs(Adipose-Derived Mesenchymal Stem cells) 및 Equine UC-MSCs(Umbilical Cord Mesenchymal Stem cells)를 골결손 유발 nude rat에 투여한 후 종양발생여부를 확인하기 위하여 수행하였다.

혈액학적검사, 혈액화학적검사, 장기중량측정과 부검의 결과에서 시험물질투여군에서 음성대조군과 비교하여 관찰된 지표들의 유의한 변화는 시험물질의 영향일 가능성이 있으나 동물 수가 적은 편이고 본시험의 군설정에서 중간용량과 저용량군이 설정되어 있지 않았으므로 그 판단이 어려웠다. 이들 변화들은 병원의 역사적 배경자료¹⁾의 정상범위 내에 있거나 약간 벗어났고, 연관된 다른 지표들의 변화 및 조직병리학적 변화가 관찰되지 않았으므로, 개체차이에 의한 변화일 것으로 판단한다.

조직병리학적 검사 결과, 모든 동물군의 투여부위(injection site)에서 관찰된 신생골에 의한 노뼈와 자뼈의 유착(adhesion by newly formed bone between the radius and ulna), 골절부위의 연결(bridging, fracture site), 신생 연골과 골의 형성증가(increased new cartilage and/or bone)는 노뼈의 골결손에 의한 동물의 치유반응과 골절부위에 투여된 시험물질에 의한 반응이 복합적으로 나타난 결과로 판단한다. 이러한 신생 연골과 골의 형태학적 구조에서 종양과 관련된 이상이 관찰되지 않아 본 시험물질은 종양형성이 없는 것으로 판단한다.

폐사동물 23 번은 많은 장기들이 없거나 자가용해로 소견을 관찰하지 못하여 사인을 찾을 수가 없었다. 폐사동물 24번은 림프절, 간과 폐에서 조직병리학적으로 악성림프종(lymphoma, malignant) 이 관찰되어 사인이 악성림프종이라고 판단한다. 악성림프종은 림프절에서 유래하여 간과 폐에 전이된 것으로 판단한다. 이 종양은 종양세포가 양성물질인 골격종세포와 세포학적 유래가 다르므로 양성물질의 투여와 무관한 자연발생으로 판단한다.

양성물질투여군에서 골격종이 수컷 1례(1/3), 암컷 3례(2/3)에서 발생하였으므로 누드 랫드를 이용한 이 시험계가 종양세포의 종양유발에 어느 정도 유효하다고 판단한다.

암수 일부 동물의 투여부위의 조직슬라이드에서 골절부위가, 그리고 일부 동물의 부갑상샘이 나타나지 않아 조직병리학적 소견이 관찰되지 않았는데, 이 점은 골절부위 경우 시험물질투여군에서 1례(1/5)가 해당되었고, 부갑상샘의 경우 다른 관련 시험항목에서 별 이상이 관찰되지 않았으므로 본 시험물질의 종양성 여부를 판단하는데 별 영향이 없을 것으로 판단한다.

혈액학적검사, 혈액화학적검사, 장기중량측정, 부검과 조직병리학적 검사의 결과를 종합하여 볼 때, 시험물질 Canine ADMSCs(Adipose-Derived Mesenchymal Stem cells) 및 Equine UC-MSCs(Umbilical Cord Mesenchymal Stem cells)를 각각 1.0×10^6 cells/head 의 용량으로 골결

7.2 분포시험

- 4주, 12주 희생하여 분석
- 그룹 당 암/수 각각 3마리, 10마리씩 이용
- 폐, 간, 투여부위 RT-PCR 분석
- 1×10^6
- (-) 4주 암/수 각 3마리 총6마리
- (cS) 4주 암/수 각 3마리 총 6마리
- (-) 12주 암/수 각 3마리 총6마리
- (cS) 12주 암/수 각 3마리 총 6마리

7.3 투여독성

- 그룹 당 암/수 각각 3마리, 10마리씩 이용
- 농도 : 고/중/저 3가지
- 3개월 12주 확인
- 2X10⁶ (고)
- 1X10⁶ (중)
- 5X10⁵ (저)

(-) 암/수 각 3마리, 총6마리

(sham) 암/수 각 3마리 총6마리

(cS1) 고농도 암/수 각 3마리 총 6마리

(cS2) 중농도 암/수 각 3마리 총 6마리

(cS3) 저농도 암/수 각 3마리 총 6마리

독성 없음 결과 확인

Chemon Study No. 17-RA-0276

최종보고서

요약

골결손 치료용 세포치료제(골분화세포)의
면역 억제된 Sprague-Dawley 랫드를 이용한
단회 골결손 부위 투여 독성시험 및 분포시험

시험번호: 17-RA-0276

시험의뢰자: CEFO Co.Ltd.,(㈜세포바이오)

㈜켄온 비임상연구소



Nonclinical Research Institute, Chemon Inc.
240, Nampyeong-ro, Yangji-myeon, Cheoin-gu, Yongin-si, Gyeonggi-do,
17162, Republic of Korea

본 시험은 면역 억제된 랫드에서 수술적 처치로 만든 골결손 부위에 골결손 치료용 세포치료제(골분화세포)를 단회 투여한 후 13 주간 관찰하였을 때 나타나는 독성평가 및 시험물질의 생체분포 평가를 위한 장기를 채취하기 위하여 수행하였다.

골결손 치료용 세포치료제(골분화세포, cS)를 5.0 x 10⁵, 2.0 x 10⁶, 4.0 x 10⁶ cells/head로 투여하는 시험물질 투여군과 골결손 치료용 세포치료제(골분화세포, eS)를 2.0 x 10⁵, 1.0 x 10⁶, 4.0 x 10⁶ cells/head로 투여하는 시험물질 투여군 및 대조군으로 무처리대조군과 수술적 처치만 동일하게 적용한 Sham 대조군을 설정하였다. 군당 암수 각 5 마리의 골결손부위에 단회 투여하였다. 또한, 시험물질의 생체분포 평가를 위한 장기를 채취하기 위하여 2.0 x 10⁶ cells/head로 투여하는 cS 군, 1.0 x 10⁶ cells/head로 투여하는 eS 군 및 Sham 대조군과 무처리대조군을 설정하여 분포 시험군을 구성하였다. 군당 암수 각 3 마리의 골결손부위에 단회 투여하였다. 분포시험군의 경우 4 주, 12 주에 부검을 실시하여 장기 적출 후 시험의뢰자에게 전달하였다.

시험항목으로 사망률, 일반증상관찰, 체중측정, 사료 섭취량, 안과학적 검사, 요검사, 혈액학적 및 혈액생화학적 검사, 장기중량측정, 부검소견관찰 및 조직병리학적 검사를 실시하였고, 그 결과는 다음과 같다.

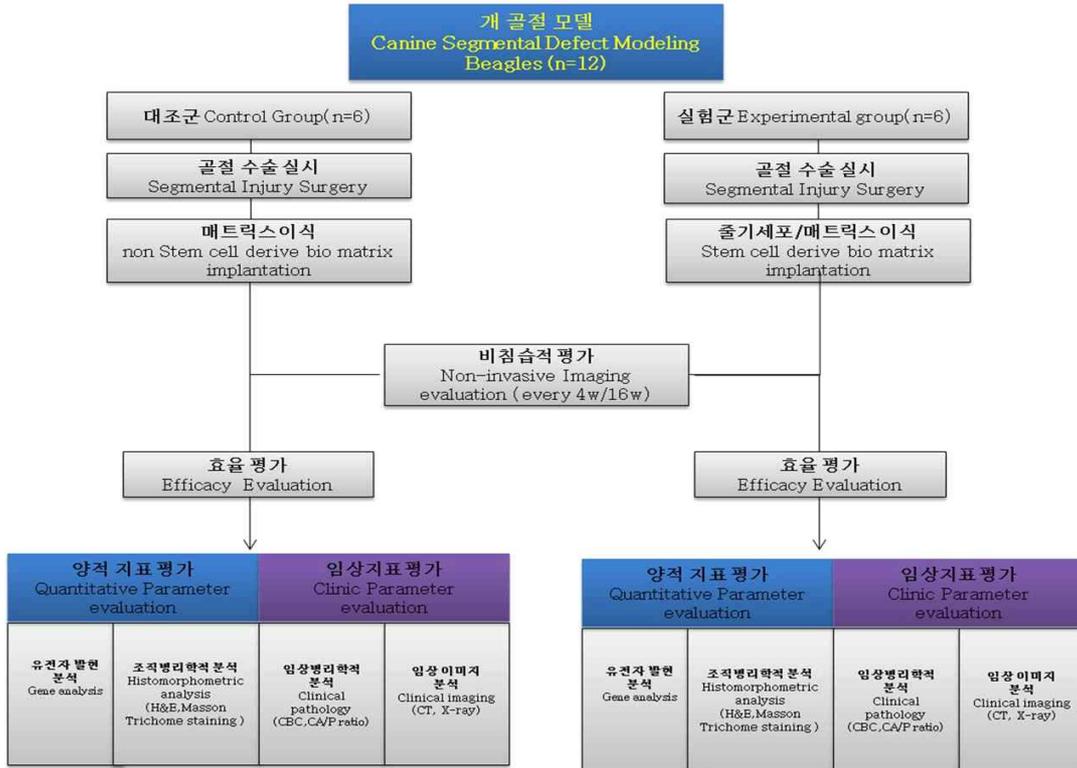
1. 일반증상 관찰 결과, 시험물질에 의한 영향은 관찰되지 않았다.
2. 체중변화 관찰 결과, 시험물질에 의한 영향은 관찰되지 않았다.
3. 사료섭취량 측정 결과, 시험물질에 의한 영향은 관찰되지 않았다.
4. 안과학적 검사 결과, 시험물질에 의한 이상소견은 관찰되지 않았다.
5. 요검사 결과, 시험물질에 의한 영향은 관찰되지 않았다.
6. 혈액학적 검사 결과, 시험물질에 의한 영향은 관찰되지 않았다.
7. 혈액생화학적 검사 결과, 시험물질에 의한 영향은 관찰되지 않았다.
8. 장기중량 측정 결과, 시험물질에 의한 영향은 관찰되지 않았다.
9. 부검소견 관찰 결과, 시험물질에 의한 영향은 관찰되지 않았다.
10. 조직병리학적 검사 결과, 시험물질 투여군의 투여부위에서 미성숙세포의 집락, 증식된 섬유조직 내 골 형성 및 골 두께의 증가가 관찰되었다.

이상의 결과를 종합하여 볼 때, 골결손 치료용 세포치료제(골분화세포)를 면역 억제된 Sprague-Dawley 랫드에 단회 투여한 후 13 주간 관찰하였을 때, 시험물질에 의한 영향으로 투여 부위에서 유의하게 관찰된 미성숙세포의 집락, 증식된 섬유조직 내 골 형성 및 골 두께의 증가가 관찰되었으나, 독성학적으로 유해한 변화가 아닌 것으로 판단한다.

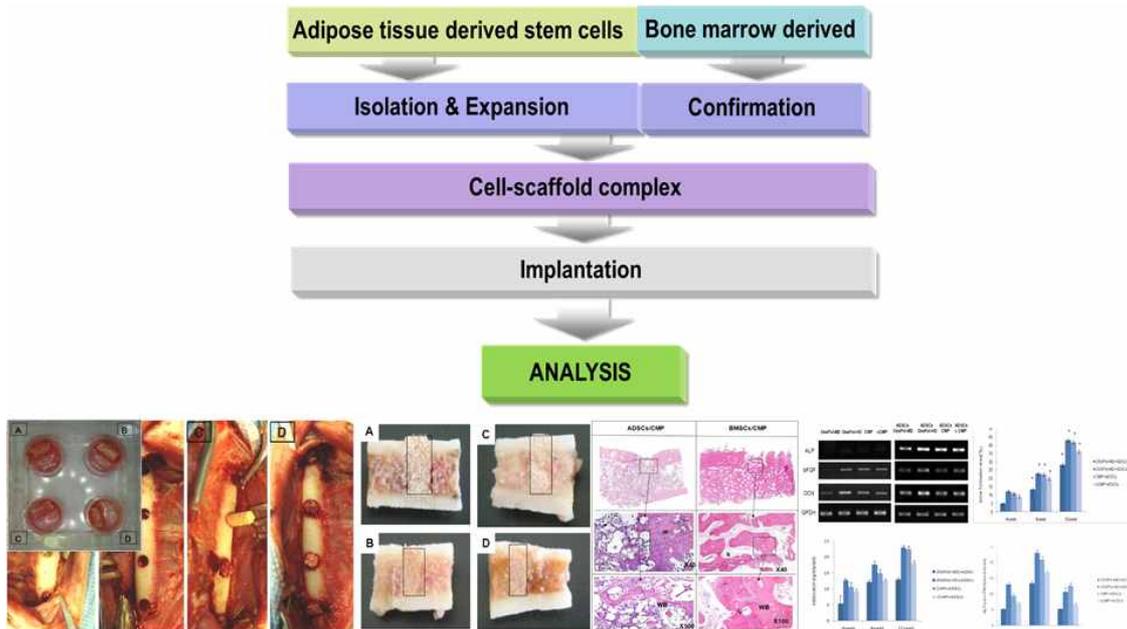
○ 제1협동 : 경북대학교

1. 임상적용후보 세포-지지체 복합체의 생체 내 유효성 평가

○ 세포치료에 최적화된 골결손 치료제를 개의 골결손 질환모델에서의 유효성 평가



<최종선정된 임상적용줄기세포 골치료제에 대한 유효성 평가 실시>



<임상적용 세포치료제의 유효성 평가>

○ 골결손 질환모델 제작 및 세포치료제-지지체 유효성 평가

- 평가동물은 개(비글, 수컷, 9개월령) 3마리를 이용함 (Dog 1, 2, 3)
- 평가동물별로 Right femur는 음성대조군으로 수술하지 않았고, Light femur는 defect를 만든 후 아래 표1과 같이 평가를 진행함

발급 번호: V16018R_2  **DGMIF**
실험동물센터
Laboratory Animal Center

실험결과보고서

지방유래 간엽줄기세포를 이용한
골세포치료제 개발을 위한
평가 프로토콜 및 유효성 평가기법 수립

수행	작성		확인			
			팀장		부장	
김희정	2017.03.10		2017.03.10		2017.3.10	
김동규	김희정	김희정	김희정	김희정	고우석	Cath
서민수						
류정주						
조우리						
강경구						
오세경						
2017년 03월 10일						

대구 경북첨단의료산업진흥재단 실험동물센터

IV. 실험결과

1. 수술 전 동물의 상태

(1) 수술 전 CBC 검사 (표 1) 및 X-ray 촬영(그림 2)을 실시하여 건강상태에 이상이 없음을 확인함.

2. 수술 후 동물의 상태

- (1) 수술 직후 1주일간 체중이 감소되는 경향을 보이다, 2주 이후부터 증가되는 경향을 나타냄. (그림 7, 표 3)
- (2) 수술 후 13일간 매일 체온측정을 실시하여 이상 발열이 없음을 확인함 (표 4).
- (3) 수술 후 proprioception 반응은 이상이 없었음.
- (4) dog1, dog2번은 수술후 3일부터 술부족 다리를 딛기 시작했고, dog3번은 술후 4일부터 딛기 시작함.
- (5) X-ray 검사에서 술후 2주부터 골결손 부위에서의 뼈재생을 확인할 수 있었으며, 4주 때 극명하게 그 반응이 확인되며 특히 Dog2에서는 다른 개체에 비해 빠른 재생을 나타내었음 (그림 8~10).
- (6) 혈청검사서 모든 개체는 Reference 대비 유의적인 소견은 없었음 (표 5).
- (7) 부검결과 모든 개체에서 유의적인 소견은 관찰되지 않았음 (표 6).
- (8) uCT 분석 결과, CT이미지 상에서 Threshold를 6000으로 하였을 시 defect에서 bone이 생성된 정도는 2-1번>3-1번>1-1번이었으며, BMD 경우 defect femur가 control femur에 비해 낮게 나왔으나 2번 개체 경우 근사치를 나타냄 (그림 11~13, 표 7).

V. 고찰

- 1. 본 실험은 비골 femur(넙다리뼈)에 골결손을 유발한 뒤, 지지체 및 세포치료제-지지체를 삽입하여 그 치유과정을 모니터링하여 지방유래 간엽줄기세포를 이용한 골세포치료제 개발을 위한 유효성 평가 기법을 수립을 위한 기초자료를 획득함.
- 2. 지지체 및 세포치료제-지지체를 삽입한 후, 모든 동물은 특이증상 없이 회복됨.
- 3. Dog 2은 Dog 1 및 Dog 2에 비해 골결손 부위의 재생이 술후 4주때 부터 확연히 나타남.

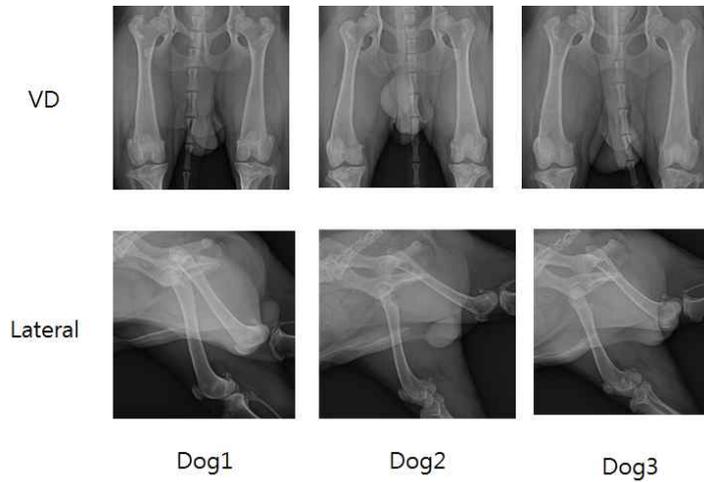
	Hole 1	Hole 2
Dog1	삽입안함	지지체
Dog2	세포치료제-지지체	세포치료제-지지체
Dog3	세포치료제-지지체 + 면역억제제 (2w)	세포치료제-지지체 + 면역억제제 (2w)

〈표1. 실험군별 평가 물질〉

- 평가모델은 femoral segmental defect model 이용

■ 수술 방법

(1) 수술 전 CBC검사 및 X-ray(그림 1.)를 촬영하여 건강상태를 확인함.

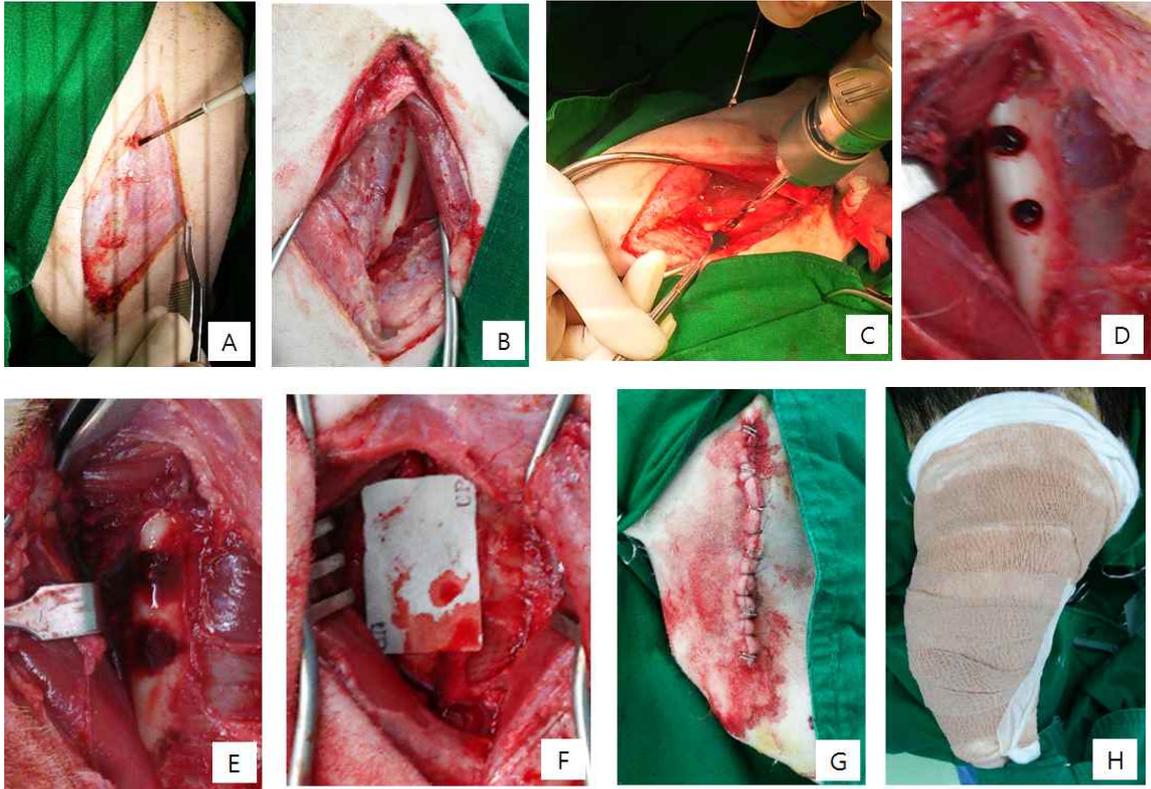


<그림1. 수술 전 촬영사진>

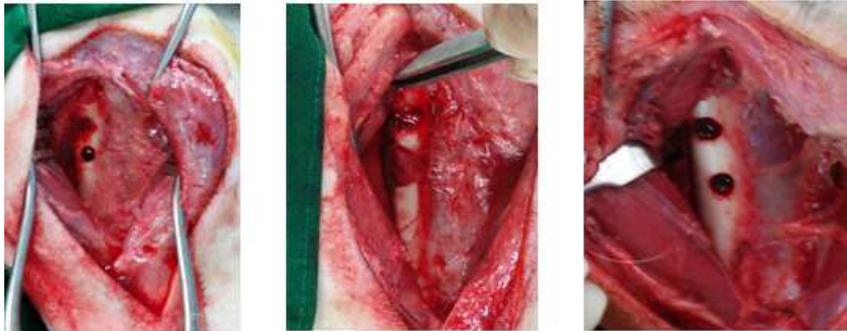
- (2) 비글견은 수술 전 12시간 이상 절식함.
- (3) brachial cephalic vein에 혈관카테터를 삽입하여 iv라인을 잡고 알파산 및 럼폰 (알파산 3mg/kg, 럼폰 2.3mg/kg)의 혼합액을 삼관이 가능할 정도까지 천천히 주입함.
- (4) 기관삽관을 실시하고 이소프로란(<2%)으로 유지 마취함.
- (5) 비글견에 SpO₂ 센서를 부착하고 환측모니터링 시스템에 연결하여 수술이 종료될 때까지 심박수, 호흡수 및 SpO₂ 의 모니터링을 실시함.
- (6) 수술대에 비글견을 right lateral recumbency 자세로 눕혀 고정하고 femur 부위를 중으로 수술부위를 제모함.
- (7) 술부에 해당하는 hind limb의 distal 말단부는 adhesive bandage로 감아 매달아 당겨진 상태로 준비하여 술부만을 노출함.
- (8) 포비돈 용액과 70% 에탄올을 이용하여 술부 주위를 소독하고, Surgical drape을 도포함.
- (9) 피부를 절개하고 (그림 2. A) 연부조직의 손상을 최소로 하여 biceps femoris muscle (넙다리두갈래근) 및 Vastus lateralis muscle(외측광근)을 분리하여 retractor 를 이용하여 cranial과 caudal방향으로 견인함.
- (10) femoral diaphysis를 3/4정도 노출시킴 (그림 2. B).
- (11) femur의 periosteum을 blade를 이용하여 분리함.
- (12) 왼쪽 femur 골간에 4.5mm 직경의 정형외과용 surgical drill을 사용하여 두 군데의 골결손을 유도하고, 5.0mm 직경의 trephine bur를 사용하여 골결손부를 다듬어 정리함 (그림 2. C, D, 그림 3).
- (13) 골결손부에 지혈제(Spongostan Standard, 존슨앤드존슨)를 채워 지혈을 실시함.
- (14) 골결손부를 지혈해가며, 각 개체에 해당되는 지지체 또는 세포치료제-지지체 복합체를 골손부위에 삽입함 (그림 2. E, 그림 4).
- (15) 세포치료제-지지체 복합체가 삽입된 골결손부를 재생용 멤브레인(Osteo guide, (주)제노스)으로 덮어 부착함. (그림 2. F)
- (16) 분리하였던 근육을 수복시키고, 근육 및 피하는 continuous suture, 피부는 simple

interrupted suture를 이용하여 봉합함 (그림 2. G)

(17) 진통제(마리트롤®, ㈜제일제약)를 2.5mg/kg 를 IM주입하고 술부를 포비돈으로 소독하고 로버트존스 봉대법을 활용하여 밴디지를 실시함. (그림 2. H)



<그림2. 수술과정 >

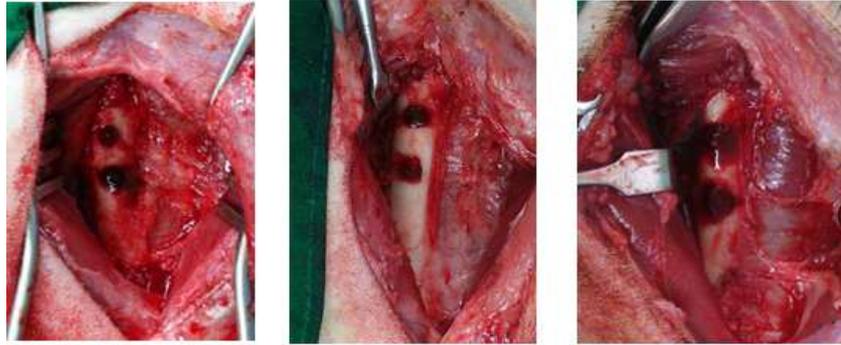


Dog1

Dog2

Dog3

< 개체별 골결손부 제작 >



Dog1

Dog2

Dog3

< 개체별 골결손부의 세포치료제-지지체 복합체 삽입 >

- (18) 진통제 2mg/kg (트리돌, 유한양행, P.O.) 및 항생제 30mg/kg를 (세파졸린주; 종근당, 수술당일~술후3일, IV. 세파셀; 삼성제약(주), 술후4~7일, PO) 술후 7일간 bid 투약함.
- (19) 3번 개체에 한하여, 수술 당일부터 총 2주간 면역억제제(싸이폴®, sid, PO)를 5mg/kg투약함.
- (20) 수술후 2주간 엘리자베스넥카라를 장착하고 술부를 소독함.

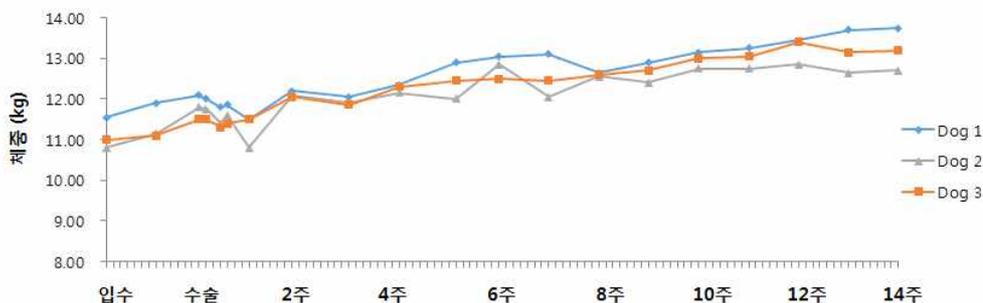
- 골형성이 완성될 때까지 임상지표에 따른 반복 추적 검사를 12주간 실시

- (1) 체중 : 주 1회 측정
- (2) 체온 : 수술 후 13일간 매일 측정
- (3) X-Ray 촬영 : 수술 전, 수술 후 3일, 2주, 4주, 8주 및 12주
- (4) 혈청검사 : 수술 1일 전, 수술 후 2주, 4주, 8주 및 12주

- 12주후 평가동물을 부검하여 femur를 채취한 후 Micro CT 및 조직학적 검사를 수행함.

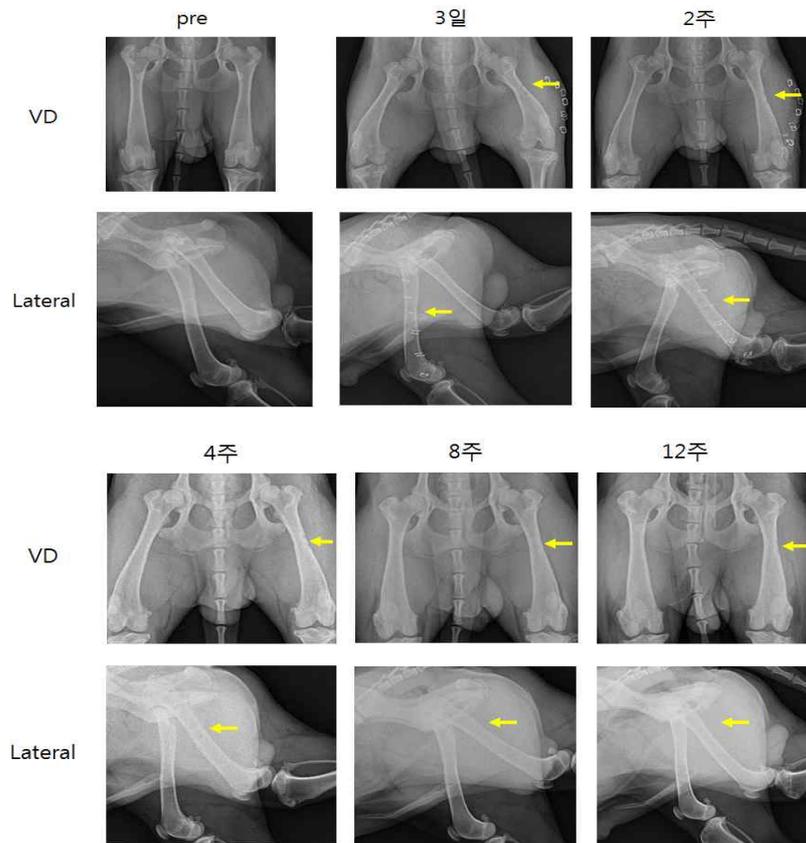
○ 골결손 질환모델 제작 및 세포치료제-지지체 유효성 평가 결과

- 수술 직후 1주일간 체중이 감소되는 경향을 보이다, 2주 이후부터 증가되는 경향을 나타냄. (그림 5)

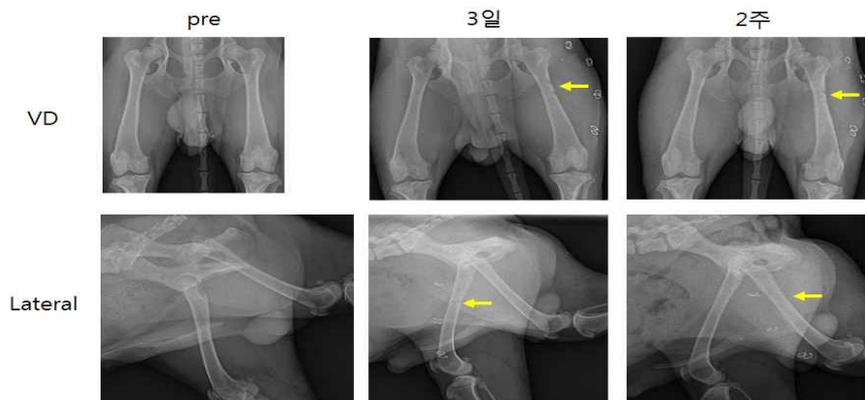


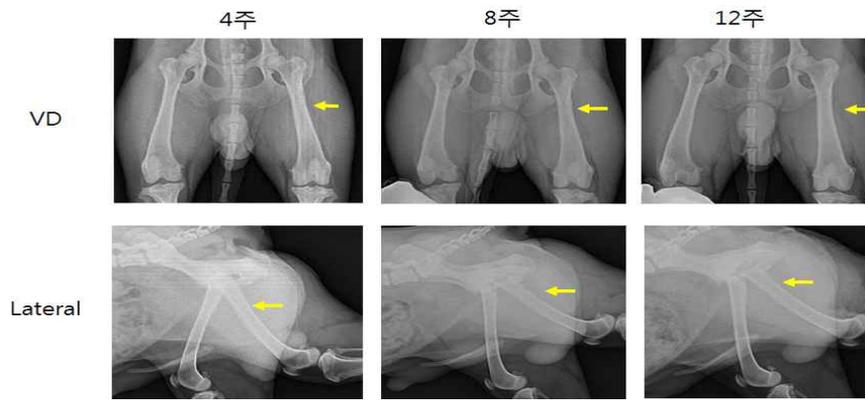
<추적 기간에 따른 체중 변화>

- 수술 후 13일간 매일 체온측정을 실시하여 이상 발열이 없음을 확인함.
- 수술 후 proprioception 반응은 이상이 없었음.
- dog1, dog2번은 수술 후 3일부터 술부 측 다리를 딛기 시작했고, dog3번은 술후 4일부터 딛기 시작함.
- X-ray 검사에서 술후 2주부터 골결손 부위에서의 뼈 재생을 확인할 수 있었으며, 4주 때 극명하게 그 반응이 확인되며 특히 Dog2에서는 다른 개체에 비해 빠른 재생을 나타내었음 (그림 6~8).
- 각 개체에 대해 X-ray를 촬영하여 결손부의 상태 변화를 추적 관찰 함.

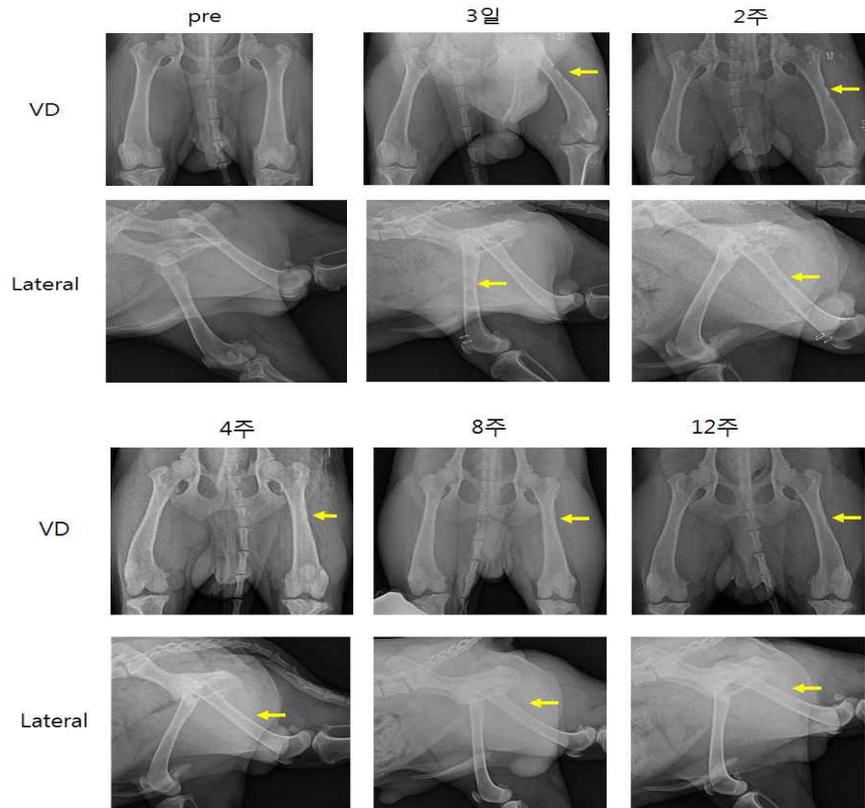


< Dog 1 X-ray 촬영사진 >



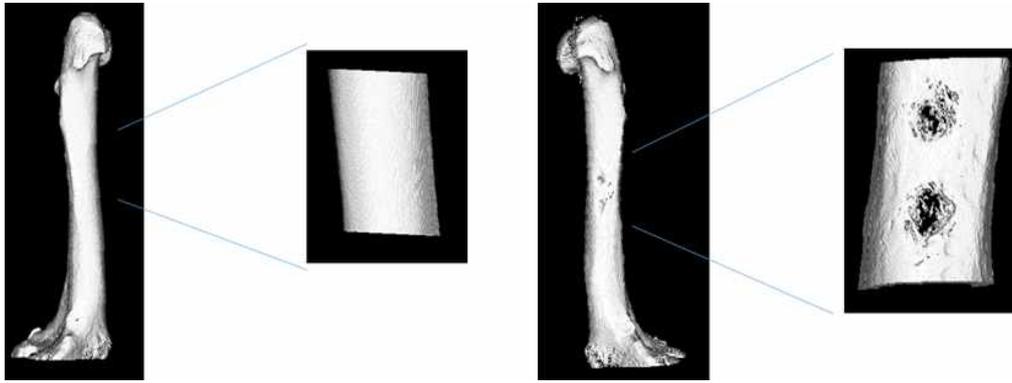


< Dog 2 X-ray 촬영사진 >

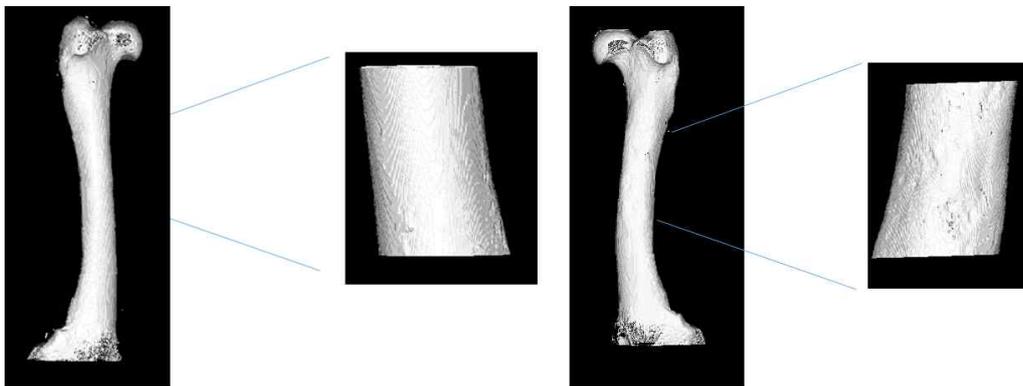


< Dog 3 X-ray 촬영사진 >

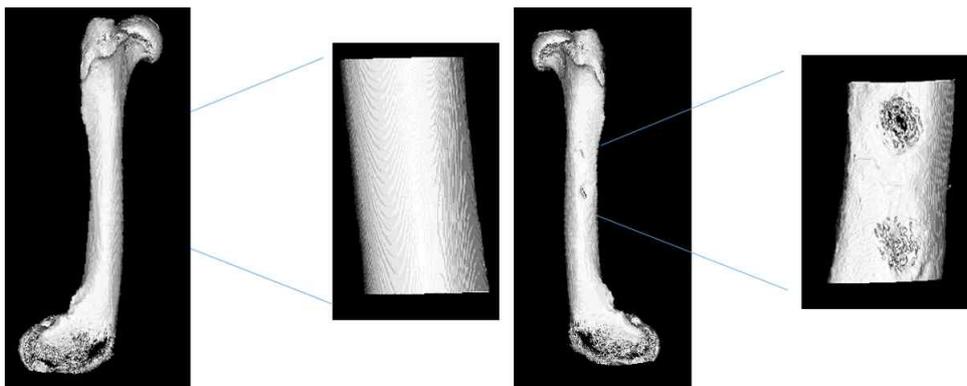
- 혈청검사에서 모든 개체는 Reference 대비 유의적인 소견은 없었음.
- 부검결과 모든 개체에서 유의적인 소견은 관찰되지 않았음.
- uCT 분석 결과, CT이미지 상에서 Threshold를 6000으로 하였을 시 defect에서 bone 이 생성된 정도는 2-1번>3-1번>1-1번이었으며, BMD 경우 defect femur가 control femur에 비해 낮게 나왔으나 2번 개체 경우 근사치를 나타냄 (micro CT 사진 및 분석 표 참조).



< Dog 1 Micro CT 사진 >



< Dog 2 Micro CT 사진 >



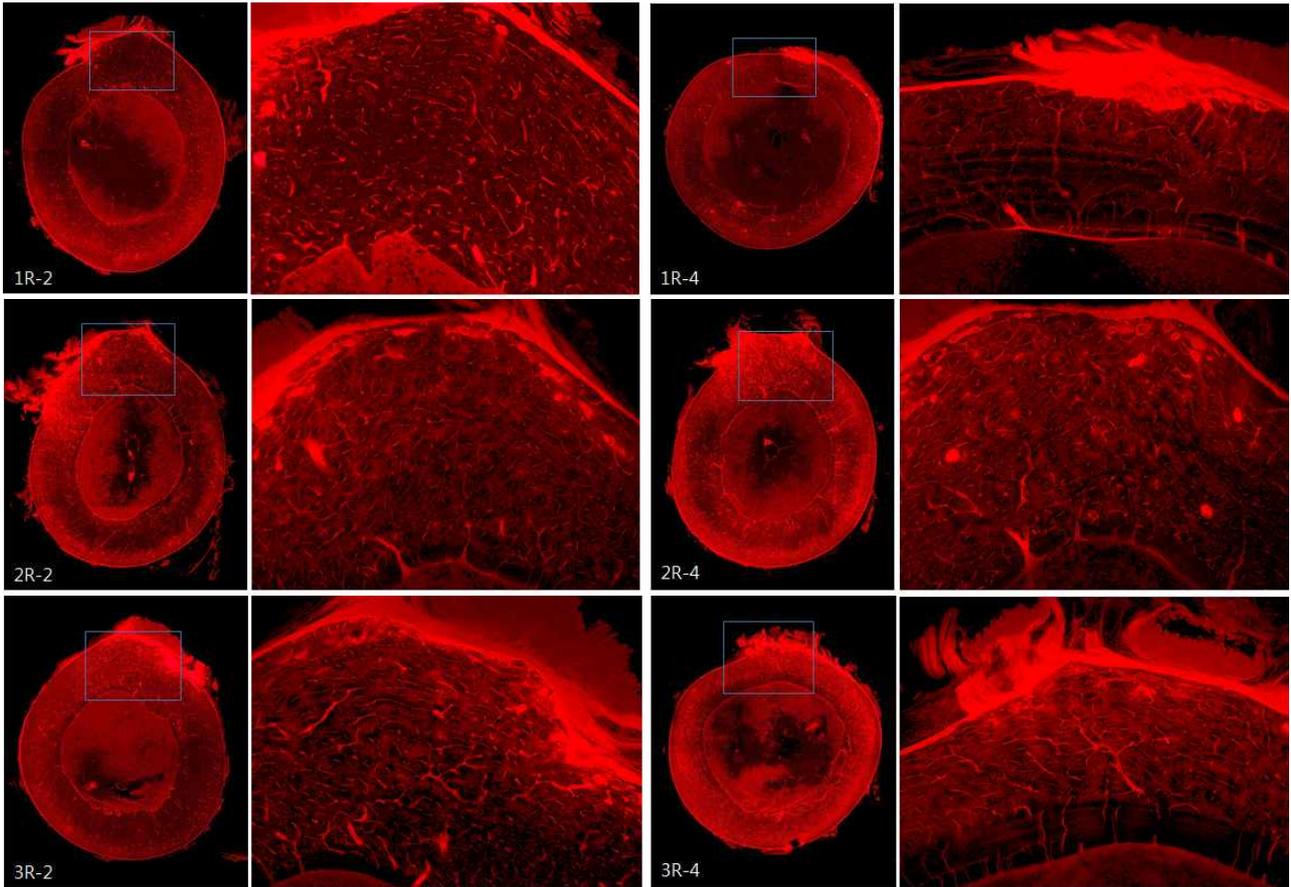
< Dog 3 Micro CT 사진 >

	Dog 1		Dog 2		Dog 3	
	Right	Left (수술)	Right	Left (수술)	Right	Left (수술)
Bone volume (mm ³)	1209.40	1235.35	1128.92	1256.79	1137.21	1216.36
Bone mineral density (mg/cc)	1347.36	1301.57	1361.17	1352.62	1366.44	1319.38

<Micro CT분석>

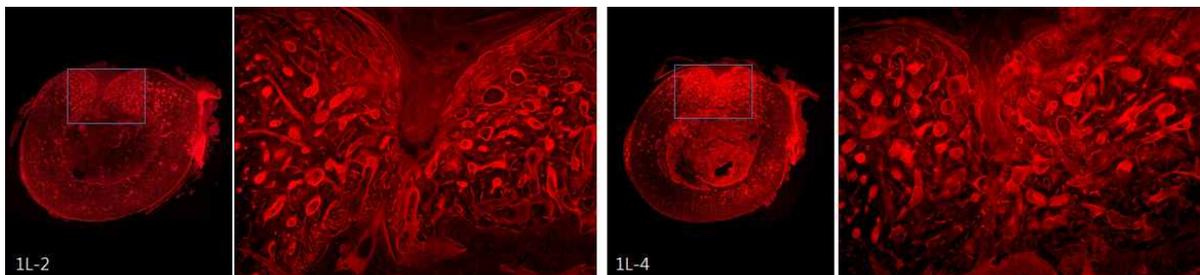
- 조직병리 검사 결과

(1) 대조군 : Dog 1, 2, 3의 Right femur는 골막, 골조직, 혈관 등에서 정상 뼈 조직의 소견을 보이고 있다.



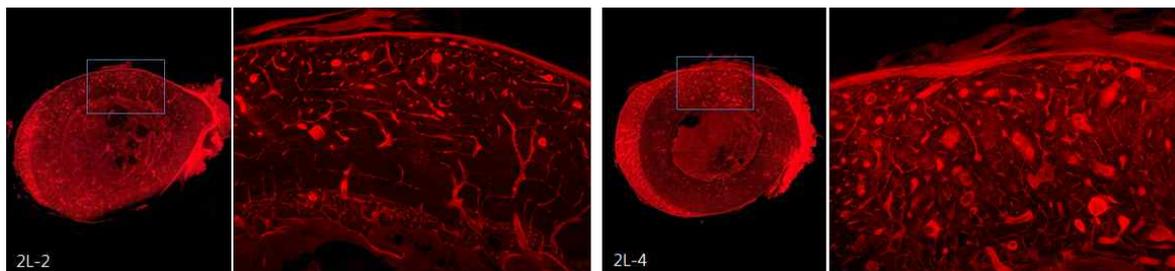
< 대조군 Right Femur 조직병리 사진 >

(2) Dog 1 : 골결손부의 골성회복이 비교적 활발히 이루어졌으나 혈관의 수적 증가와 주변공간의 확장으로 골밀도가 주변 정상 골조직에 비해 뚜렷한 감소를 보이고 있다. 또한, 치밀골의 외측면에서 부분적인 함몰상이 관찰되며, 이 부위는 골조직 이 아닌 섬유성 결체조직으로 채워져 있다. 반면, 치밀골의 내측면은 완전한 연속성을 회복하고 있으며 특별한 반응성 골형성은 관찰되지 않는다.



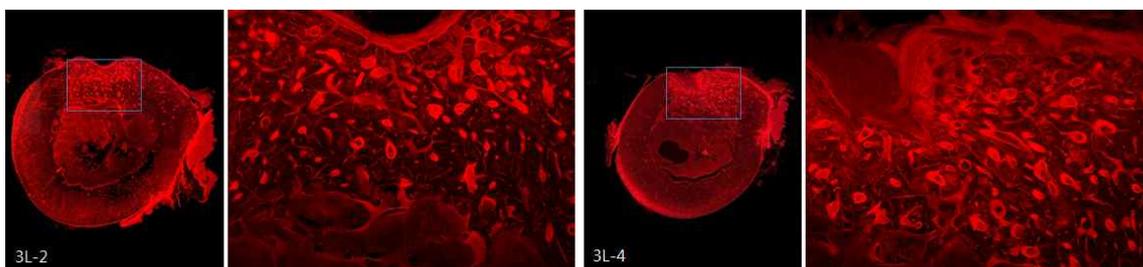
< Dog 1 Left femur 조직병리 사진 >

(3) Dog 2 : 골결손부 영역이 정상적인 치밀골과 유사한 두께와 외형을 회복하여 주위 정상골과 뚜렷한 차이를 보이지 않고 있다. 단지, 상대적인 혈관 분포의 증가로 전반적인 골조직 밀도가 감소된 양상을 보일 뿐이다.



< Dog 2 Left femur 조직병리 사진 >

(4) Dog 3 : 결손부의 골성회복이 양호하게 진행되어 결손부의 연속성은 완전히 이루어졌으나 치밀골 외측면에서 섬유성결체조직으로 채워진 미약한 함몰상이 관찰된다. 골성회복을 이루고 있는 새롭게 형성된 피질골은 혈관분포가 증가되면서 주위정상 골조직에 비해 골밀도가 다소 미약한 소견을 보이고 있을 뿐 특기할 차이를 보이지 않고 있다.



< Dog 3 Left femur 조직병리 사진 >

● 골결손 질환모델 제작 및 세포치료제-지지체 유효성 평가 고찰

- 세포-지지체 복합체의 중대동물 적용 프로토콜 구축과 임상적용 유효성 평가지표 검증
- 세포-지지체 복합체의 골결손 동물모델 적용 결과, 독성 혹은 임상적으로 이상반응 소견을 보이지 않아 안전성에는 이상이 없고, X-ray, Micro CT 및 조직병리 결과에서 세포-지지체 복합체가 아무 처리하지 않은 대조군과 비교해 골재생능에 유효한 것으로 평가됨.

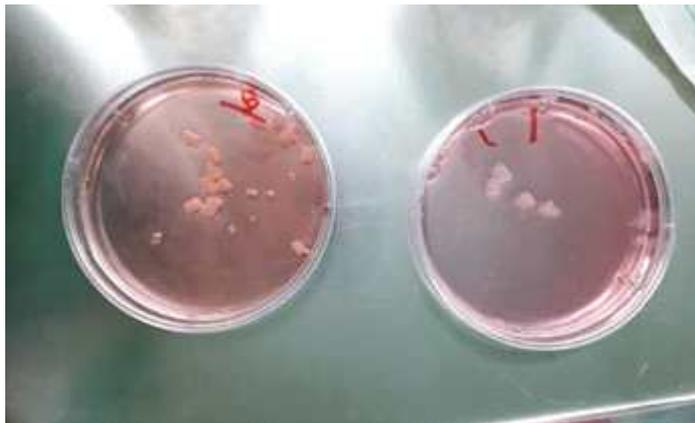
확립된 SOP 기반 개 개체수 확대 둔부유래 배양 MSC 활용 골결손 모델에서 골형성 평가

1. 실험 방법

- 1) 수술 전 건강상태를 확인하고 수술 전 12시간 이상 절식함.
- 2) Brachialcephalic vein에 혈관카테터 삽입한 후 마취제 (알파산 3 mg/kg + 렘폰 2.3 mg/kg)을 주사함.
- 3) 기관삽관 실시 후 이소프로란(<2%)으로 유지 마취한다. 본 실험은 8~12kg 의 Beagle 을 대상으로 실험을 실시함.

- 4) 실험동물에 SpO2센서를 부착하고 모니터링 시스템에 연결하여 수술완료시까지 심박수, 호흡 등을 모니터링함.
- 5) 수술대 위의 실험동물의 자세를 보정하고 수술부위를 제모함.
- 6) 수술부만 도출될 수 있도록 준비 후 수술부위를 소독함.
- 7) Femur 골간에 4.5 mm 직경의 정형외과용 드릴을 사용하여 두 군데의 골결손을 유도하고, 5mm 직경의 trephine bur를 이용하여 골결손부를 다듬어 정리함.
- 8) 골결손부에 지혈제를 채워 지혈을 실시하면서 지지체와 세포치료제-지지체 복합체를 골결손 부위에 삽입함.
- 9) 골결손부위를 멤브레인(Osteo guide)로 덮고 이후 근육, 피하, 피부 순으로 수복한 후 봉합함.
- 10) 진통제(마리트론 2.5mg/kg, IM)를 주사하고 수술부위를 소독하고 로버트존스 붕대법을 활용하여 밴디지를 실시함.
- 11) 수술후 7일간 진통제(트리돌, 2mg/kg, PO)와 항생제(수술3일까지 세파졸린주 30 mg/kg, IV, 수술4일-7일까지 세파셀 30 mg/kg, PO)를 하루 2회 투약함.
- 12) 수술후 2주간 엘리자베스 넥카라를 장착하고 수술부위를 소독함.

2. 줄기세포 지지체: 줄기세포와 지지체 모형



3. 수술 과정

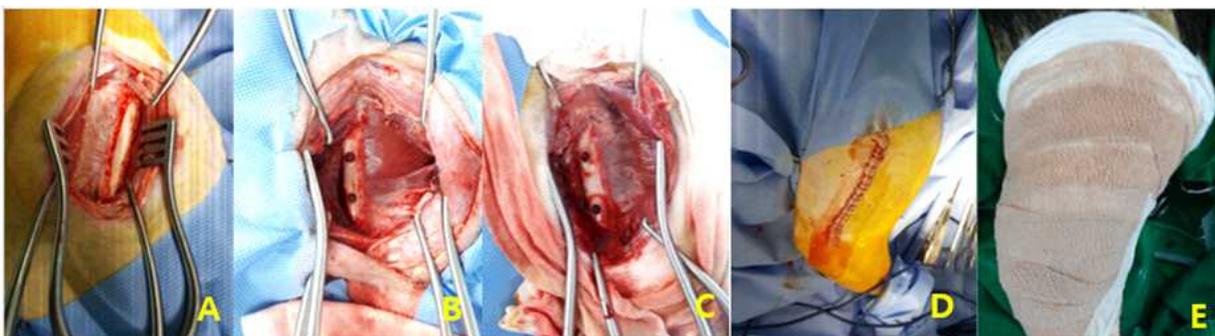
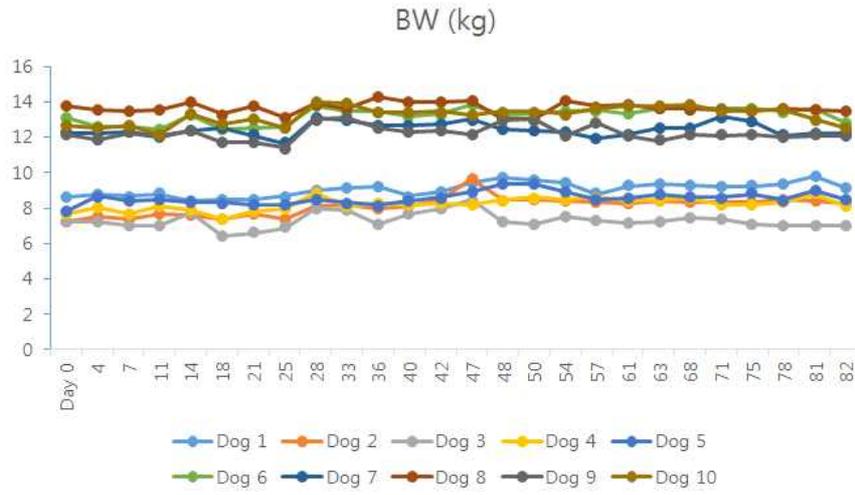


그림1. 수술 과정 사진

A: 대퇴골 노출 B: 골결손 유발 C: 세포치료제-지지체 삽입 완료 D: 수술부위 봉합 E: 붕대

4. 개체 정보 및 체중 측정 결과 (2회/주)



Animal #	Breed	DOB	ID	Sex
1	Beagle	20180215	KHBAUC	F
2	Beagle	20180215	KHBATW	F
3	Beagle	20180217	KHBATJ	F
4	Beagle	20180223	KHBAXP	F
5	Beagle	20180227	KHBBAD	F
Animal #	Breed	DOB	ID	Sex
6	Beagle	20180215	KHBATE	M
7	Beagle	20180219	KHBAWS	M
8	Beagle	20180219	KHBAWU	M
9	Beagle	20180224	KHBAXU	M
10	Beagle	20180226	KHBBAF	M

Animal#	Breed	DOB	ID	Sex	20181025	20181029	20181101	20181105	20181109	20181112	20181115	20181119	20181122	20181126	20181129	20181203	20181206	20181210	20181212	20181217	20181218	20181220	20181224	20181227	20181231	20190101	20190107	20190110	20190114	20190117	20190121	20190122	20190123	
1	Beagle	20180215	K484UC	F	8.30	8.70	8.65	8.75	8.70	8.80	8.40	8.90	8.90	8.70	9.00	9.15	9.20	8.70	8.90	9.45	9.75	9.60	9.40	8.80	9.25	9.35	9.30	9.20	9.25	9.35	9.80	9.15	20g #3	
2	Beagle	20180215	K484TV	F	7.40	7.20	7.25	7.50	7.40	7.70	7.80	7.35	7.65	7.40	8.10	8.20	8.00	8.10	8.45	9.65	8.45	8.90	8.40	8.35	8.25	8.40	8.35	8.35	8.35	8.30	8.40	8.25	20g #3	
3	Beagle	20180217	K484AT	F	7.10	7.15	7.25	7.25	7.00	7.00	7.75	6.40	6.60	6.90	7.95	7.90	7.10	7.70	8.00	8.45	7.25	7.10	7.90	7.30	7.15	7.25	7.45	7.35	7.10	7.00	7.00	7.00	20g #3	
4	Beagle	20180223	K484VF	F	7.80	8.15	7.65	8.05	7.70	8.10	7.90	7.40	7.80	7.95	8.85	8.10	8.25	8.20	8.25	8.20	8.45	8.80	8.90	8.60	8.40	8.45	8.55	8.20	8.20	8.35	8.80	8.10	20g #3	
5	Beagle	20180227	K484AD	F	9.30	8.95	7.85	8.70	8.40	8.50	8.35	8.30	8.20	8.20	8.90	8.30	8.15	8.40	8.60	8.90	9.35	9.35	8.90	8.50	8.55	8.75	8.65	8.60	8.80	8.45	9.00	8.90	20g #3	
Animal#	Breed	DOB	ID	Sex	20181025	20181029	20181101	20181105	20181109	20181112	20181115	20181119	20181122	20181126	20181129	20181203	20181206	20181210	20181212	20181217	20181218	20181220	20181224	20181227	20181231	20190101	20190107	20190110	20190114	20190117	20190121	20190122	20190123	
6	Beagle	20180215	K484TE	M	13.20	12.90	13.1	12.80	12.60	12.45	13.25	12.45	12.95	12.80	13.80	13.90	13.45	13.20	13.30	13.85	13.25	13.95	13.90	13.92	13.95	13.65	13.60	13.65	13.45	13.60	13.80	13.00		
7	Beagle	20180219	K484WS	M	12.30	12.30	12.25	12.20	12.30	12.05	12.35	12.95	12.10	11.65	13.10	12.95	12.70	12.75	13.00	12.45	12.40	12.30	11.90	12.15	12.30	12.90	12.15	12.90	12.10	12.20	12.20	12.20	11.70	
8	Beagle	20180219	K484WU	M	14.20	13.90	13.8	13.95	13.90	13.95	14.00	13.90	13.80	13.10	13.90	13.65	14.05	14.00	14.00	14.00	13.05	13.00	14.10	13.75	13.95	13.65	13.60	13.95	13.90	13.65	13.95	13.90	13.20	
9	Beagle	20180224	K484WU	M	12.40	12.00	12.15	11.85	12.25	12.00	12.40	11.70	11.70	11.40	13.00	12.10	12.90	12.35	12.15	12.95	13.00	12.05	12.85	12.05	11.80	12.15	12.10	12.15	12.00	12.10	12.05	11.60		
10	Beagle	20180226	K484AF	M	13.00	12.80	12.65	12.90	12.70	12.15	13.35	12.75	13.05	12.95	14.00	12.95	13.40	13.40	13.45	13.25	13.45	13.45	13.30	13.65	13.80	13.80	13.85	13.90	13.95	13.95	13.00	12.90	12.20	

5. 방사선 촬영(X-ray)측정

	Pre	Day 0	Day 3	Day 14
Dog 1.				
Dog 2.				
Dog 3.				
Dog 4.				
Dog 5.				
	Pre.	Day0.	Day3.	Day14.
Dog 6.				
Dog 7.				
Dog 8.				
Dog 9.				
Dog 10.				

7. 부검 및 임상병리 결과: 육안적으로 복부장기 정상과, 손상부위 세포치료 효과가 개 암수 각각 개체 2,4,5,6,8,10 차별성을 나타냄.

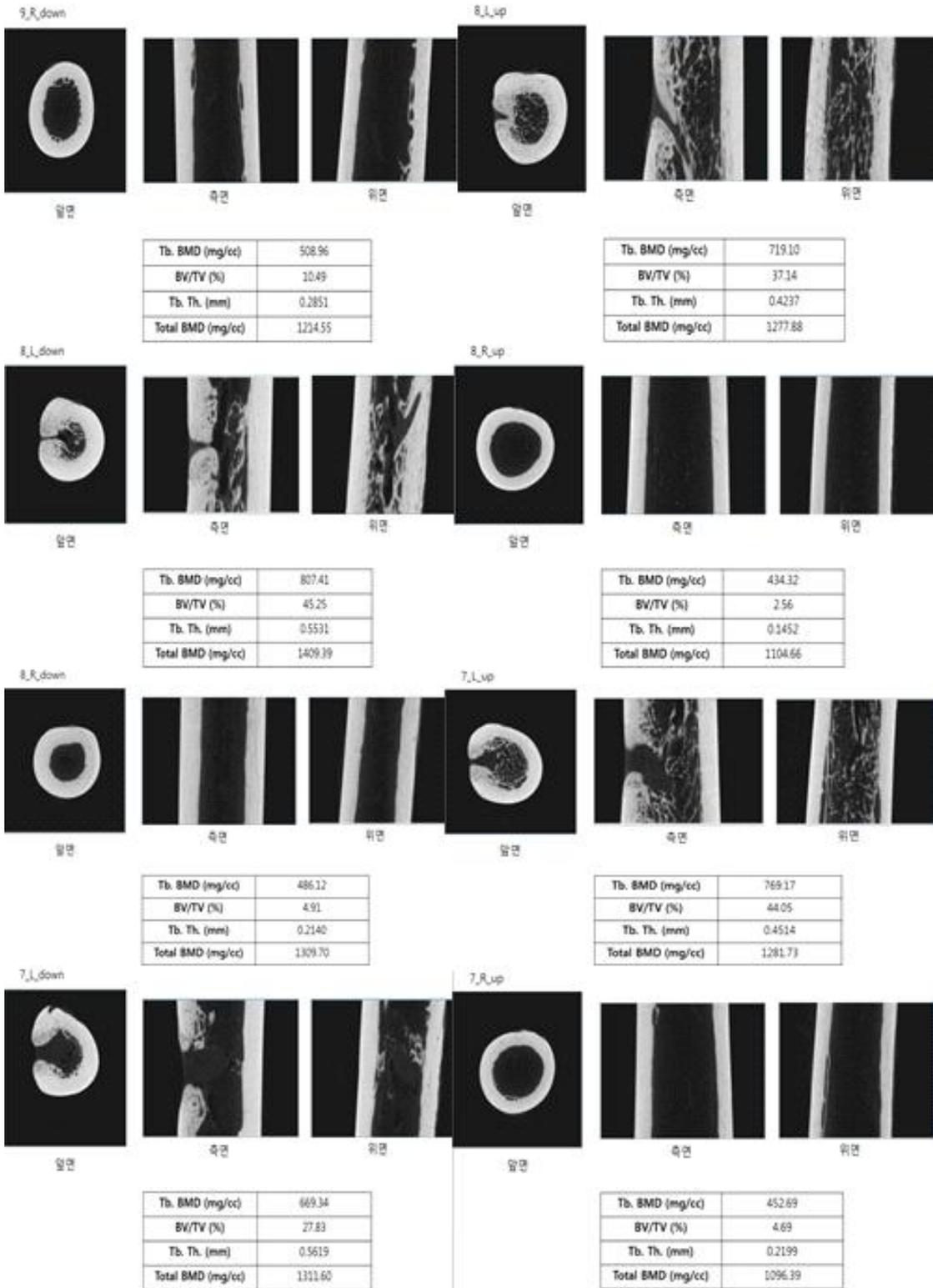


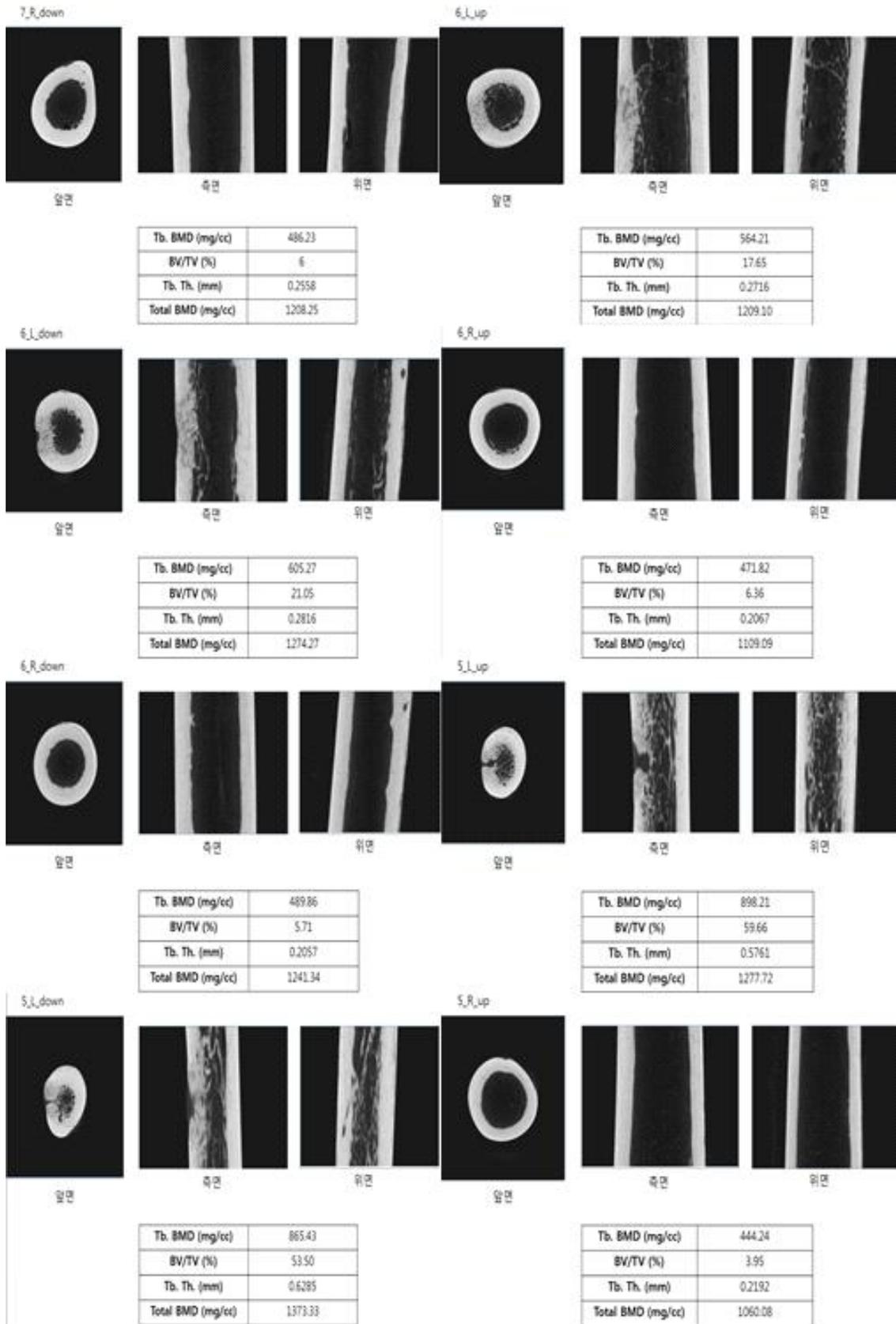
8. 개체별 대퇴골 육안사진(1-5개체)

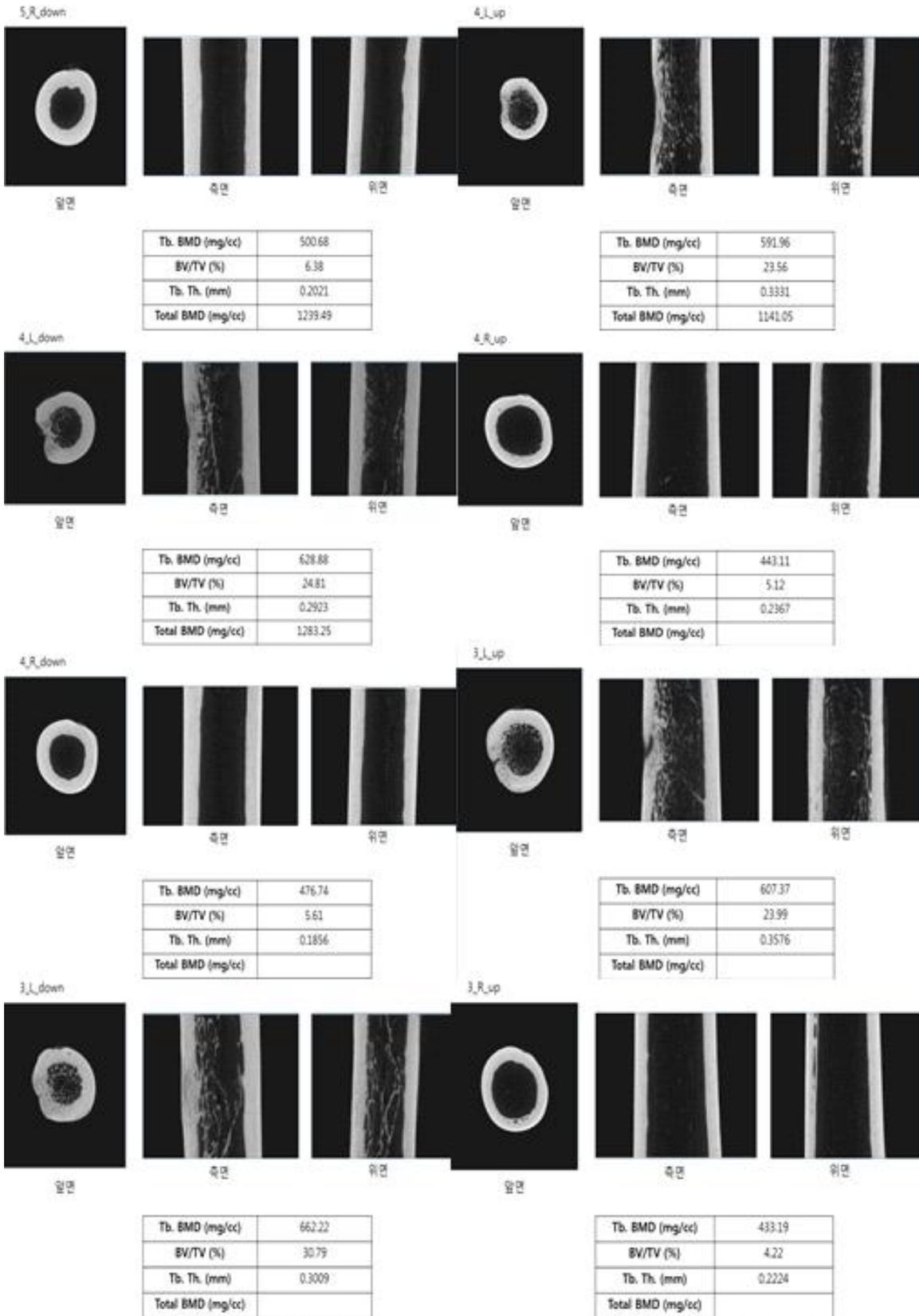


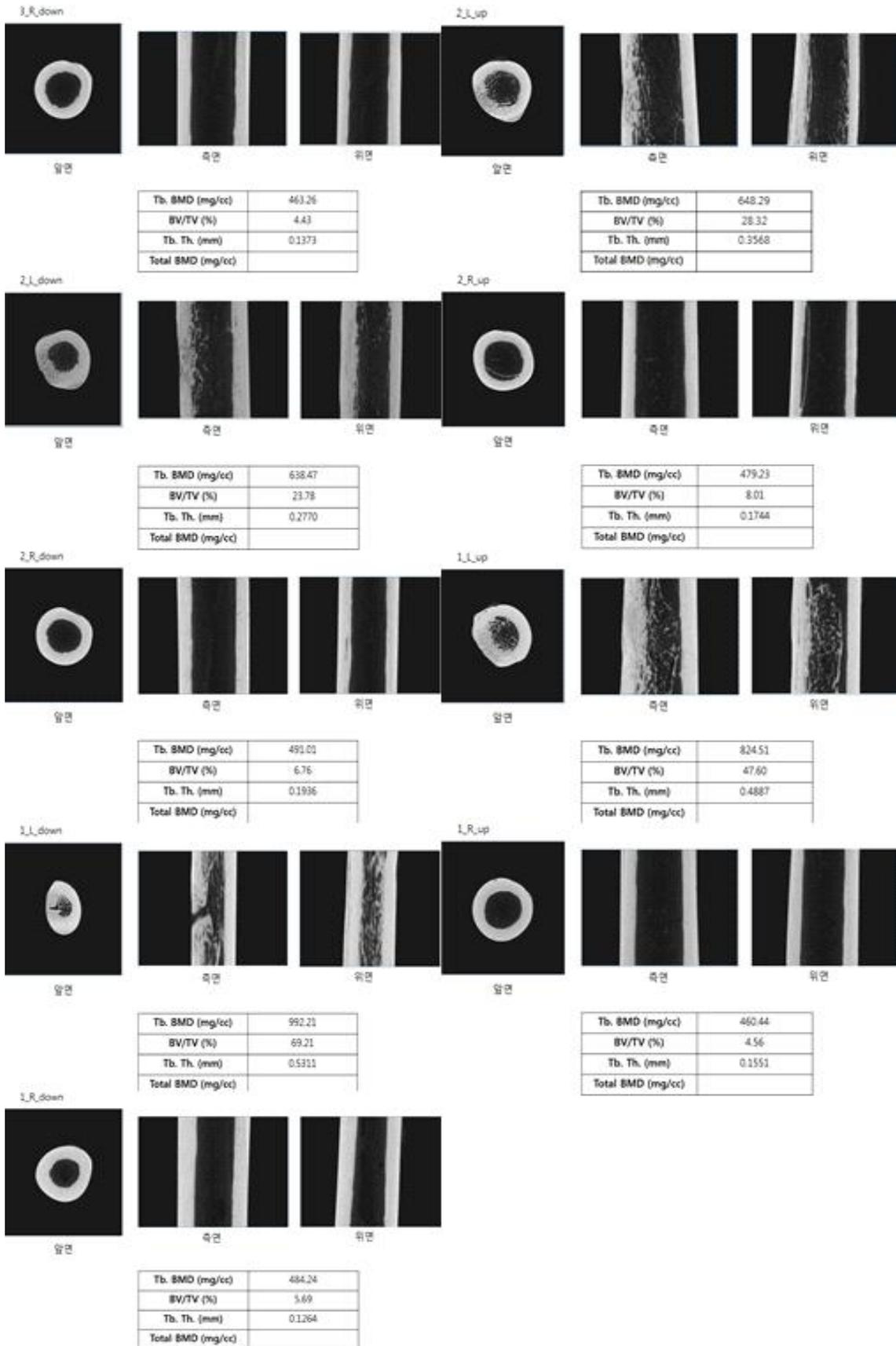
9. 개체별 대퇴골 육안사진(6-10개체)







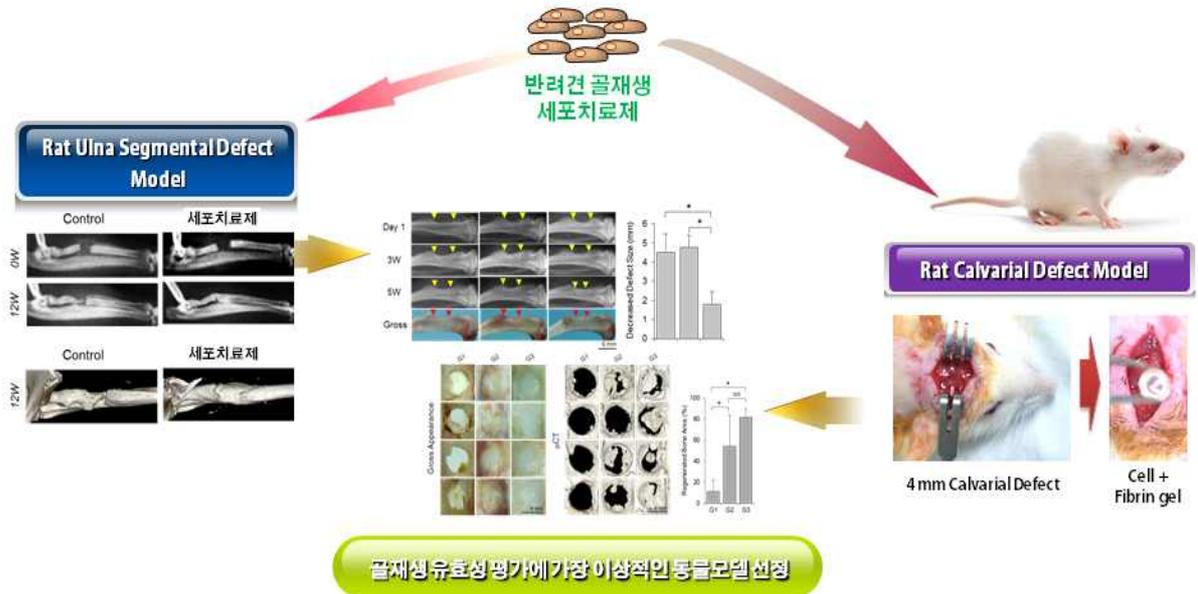




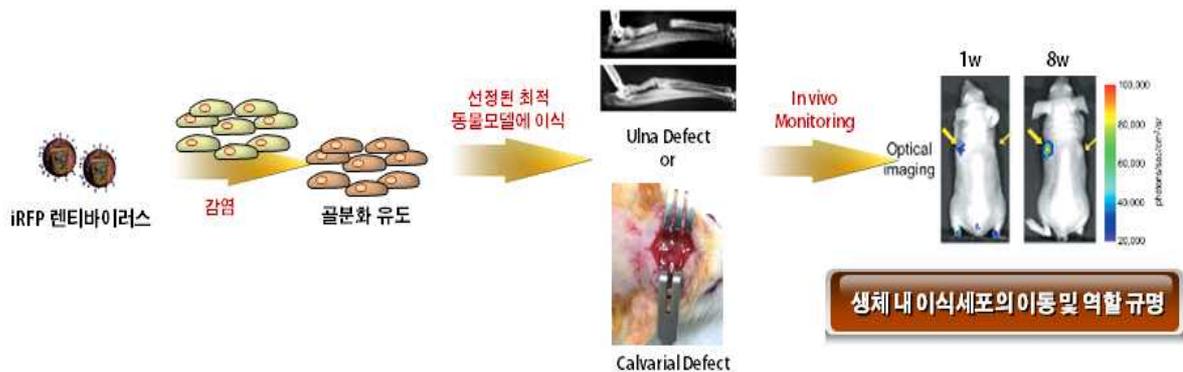
○ 제2협동 : 동국대학교

○ 소동물 골재생 유효성을 보다 전문적으로 평가할 수 있는 모델을 확립하여 대동물 모델에서 유효성을 평가할 수 있는 최종 세포치료를 선정하였음.

○ 계획한 바대로 NIR계 형광단백질 발현 렌티바이러스 시스템을 구축하여 이를 이용하고자 하였으나 최종 선정된 세포치료가 3-D 분화유도 단일세포군임에 따라 주관연구기관이 개발한 fluorescent q-dot NP 기반으로 세포치료를 표지하고 생체 내 이식한 후 세포의 생체 내 생물학적 활성을 평가함.



< 반려견용 세포치료제의 골재생 평가를 위한 동물모델의 개발 >



< In vivo 모니터링을 통한 이식세포의 생체 내 추적기술 개발 >

○ Radius Defect 모델에서 유효성 관찰

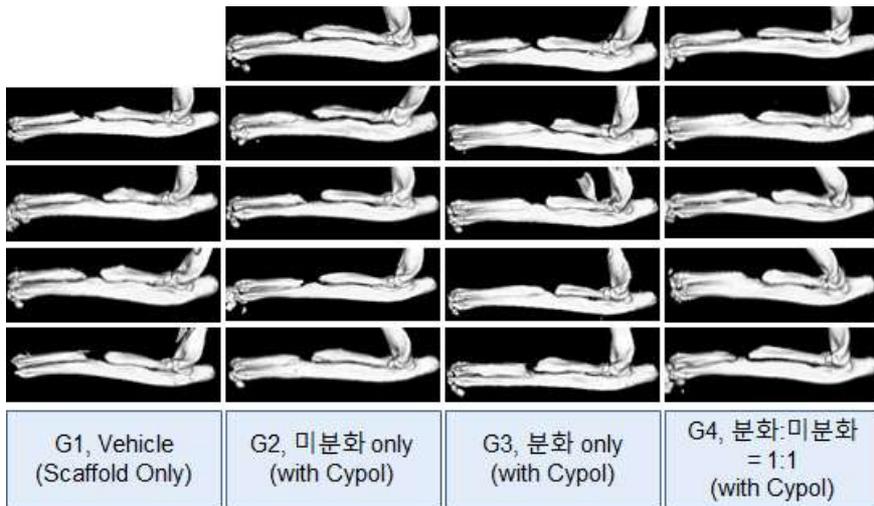
유효성 시험 결과보고서

쥐 5-mm Radial Segmental Defect 모델에서 개의 지방줄기세포 이식에 의한 골재생 효능 분석 연구

- 요골 재생 효능 분석 -

시험기관: 동국대학교 일산병원

시험책임자: 이 중 민 *Jeongmin Lee*



< 쥐의 요골 결손 모델에서 12주 유효성 확인 >

확실한 유효성 평가를 위해 앞다리 요골에 완전 골결손을 만들고 12주 동안 추적 관찰하여 세포치료제의 성능을 관찰함.

미분화 줄기세포를 이식하는 경우보다 골분화 유도된 세포를 이식하는 경우 골재생 정도가

결 과

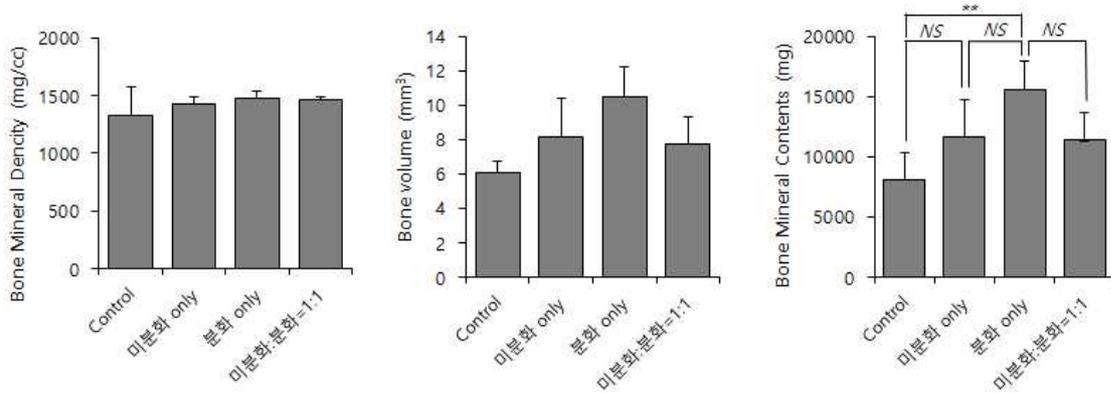
1. 재생조직의 Gross와 X-ray 및 μ CT 분석, Histological staining 결과

수술 후 defect size가 동일한지를 확인하기 위하여 X-ray 분석을 실시하였고, 그 결과 모든 그룹에서의 defect size가 동일하다는 것을 확인하였음. 육안관찰을 통해 G1 음성대조군 대비 G2 (미분화 Canine ASCs 처리군) 그룹, G3 (분화 Canine ASCs 처리군) 그룹 및 G4 (미분화 Canine ASCs와 분화 Canine ASCs의 1:1 혼합셀 처리군) 그룹에서 골재생이 이루어진 것을 확인하였음. 특히 G3 (분화 Canine ASCs 처리군) 그룹의 골재생 정도가 다소 우수함이 확인되었으며 인위적 두개골 결손 부위에 신생골들이 비교적 다량으로 재생된 것을 확인할 수 있었음. 이러한 골재생 유효성 결과들은 μ CT 분석을 통해서 확실히 구분이 가능하며, 그 분석결과 거의 신생골 재생이 이루어지지 않은 G1 음성대조군 대비 이중 줄기세포를 이식한 G2, G3, G4 그룹들은 골결손 부위가 재생된 것으로 확인됨. 또한, 그 골결손 재생정도는 육안관찰 결과와 마찬가지로 분화 Canine ASCs 처리한 G3 그룹에서 더 우수한 것으로 확인됨. Histological staining 결과에서도 마찬가지로 G1 음성대조군 대비 시험군에서 골재생이 이루어진 것으로 확인됨. 그 중에서도 분화 Canine ASCs 처리한 G3 그룹에서 재생정도가 훨씬 높은 것을 알 수 있었음. μ CT 분석을 정량화하여 나타난 결과, G3 그룹이 G1 음성대조군 보다 평균적으로 재생된 뼈 범위가 유의적으로 높았음. 반면 미분화 Canine ASCs 처리한 G2 그룹과 미분화 Canine ASCs와 분화 Canine ASCs의 1:1 혼합셀을 처리한 G4 그룹은 G1 음성대조군보다 평균 뼈 볼륨은 높았으나 유의적인 차이를 보이지 않았음.

고찰 및 결론

본 실험은 개의 지방유래줄기세포의 이식에 따른 유효성을 평가하기 위한 연구임. 개의 지방유래 줄기세포를 SD rat의 골결손 부위에 이식 후 시험기간 동안 동일하게 면역억제제를 처리한 후 분석한 결과, 미분화 세포, 분화 세포 및 혼합한 세포가 음성 대조군 대비 골결손 부위가 재생되었으며 특히 분화 유도된 세포를 이식한 그룹에서 골재생 효율이 유의적으로 높은 것을 확인할 수 있었음. 다만, 이 결과는 개의 지방유래줄기세포에만 국한되며, 동종이나 이외의 이중 줄기세포의 경우 동일한 결과가 산출될 것이라고 확신할 수 없음.

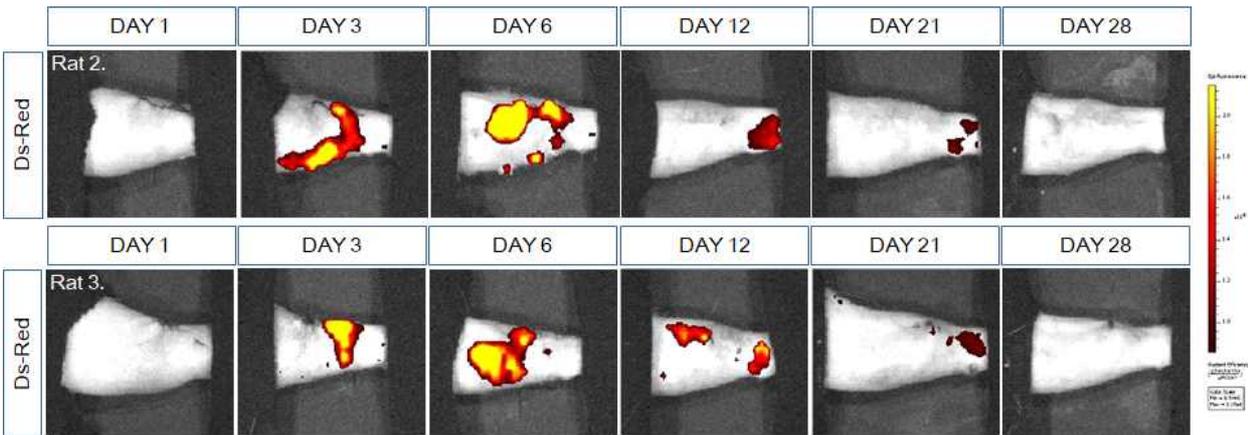
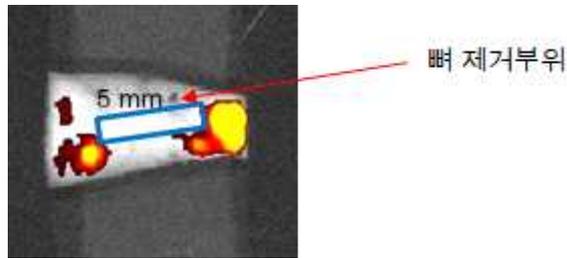
보다 효과적인 것으로 나타남.



(*p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001, NS: not significant)

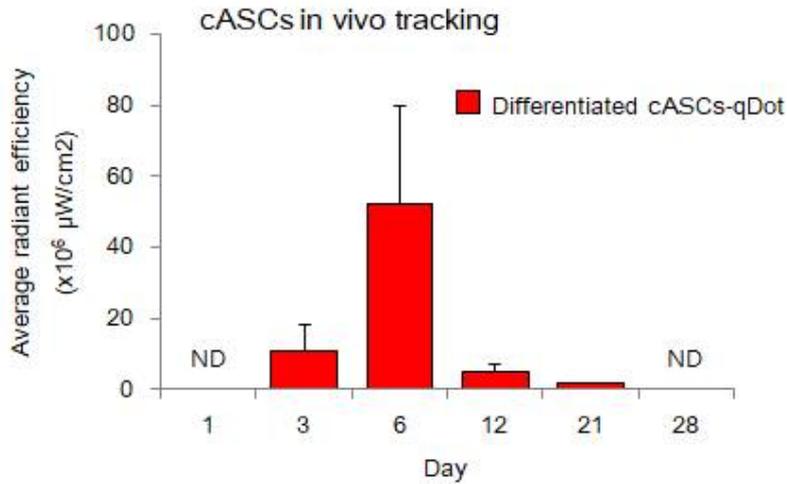
정량적인 평가에서도 골분화 유도한 경우 가장 성능이 우수한 것으로 나타남.

○ Radius Defect 모델에서 세포의 이동 확인



<형광 나노입자 표지 세포의 생체내 이동상 확인>

형광 나노입자로 표지하여 세포의 이동상을 확인한 결과 21일까지는 세포가 확인되나 1개월째에는 형광 표지된 세포가 확인되지 않았음. 이미징결과에서 보듯이 이식된 세포가 이식부위에 머무르지 않고 주로 양방향으로 분산되어 나타남. 원인은 아래 그림처럼 뼈 절단부위 양끝에 주로 분포하여 세포가 재생 역할을 수행하는 것으로 판단됨.



<형광 나노입자의 발현 강도 확인>

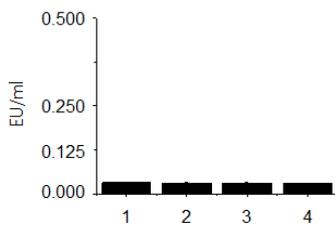
정량분석 결과도 유사하게 형광사진에서 보여준 바와 같이 유사하게 나타남.

정량결과 수술 당일 및 24시간 경과 후에는 미약하거나 검출되지 않으며 (아마도 이식재료에 의한 fluorescence quenching 현상이 아닐까?), 6 일째 GFP, iRFP 및 DsRed 과장에서 모두 가장 높은 signal을 보였으며 21일 이후로는 검출되지 않는 것으로 보아 세포이식 후 3주가 지나면 주로 paracrine effect에 의존하는 것으로 보임. 향후 면역억제제도 paracrine effect를 극대화하기 위해 3주 이상 처리하지 않는 것이 좋을 것으로 사료됨.

○ 제3협동 : 검역본부

○ 반려견용 골세포치료제 품질관리 항목 설정

- 엔도톡신 한도 시험



모든 시험군에서 0.125EU/ml의 값으로 엔도톡신은 매우 낮은 것으로 나타남.

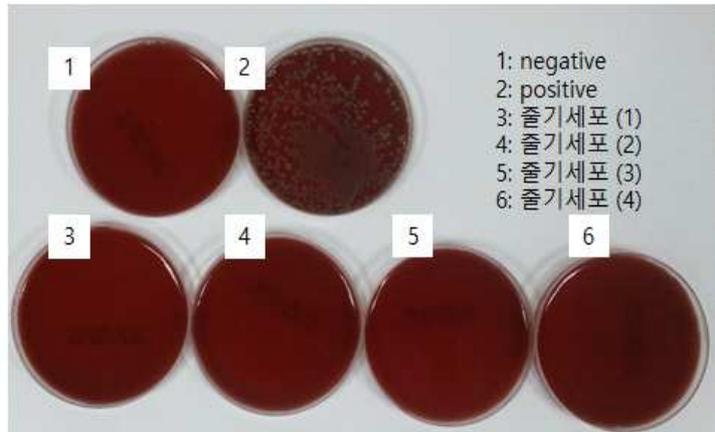
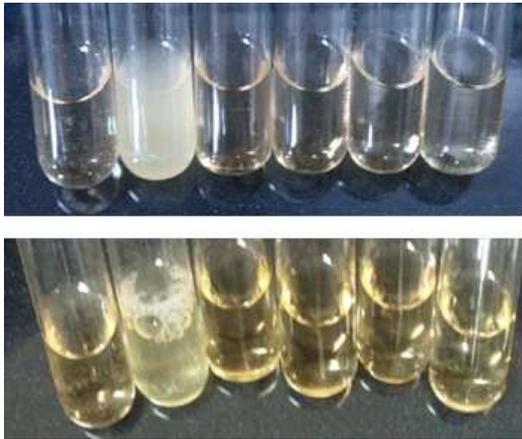
- 마이코플라스마 부정시험

PCR법을 이용하여 측정함.

인큐베이터 5대에서 세포배양, 모두 음성값이 나옴.

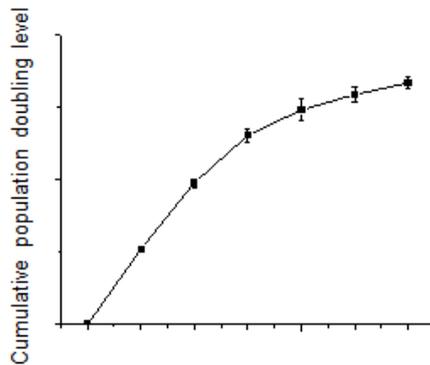


- 미생물 부정 검사

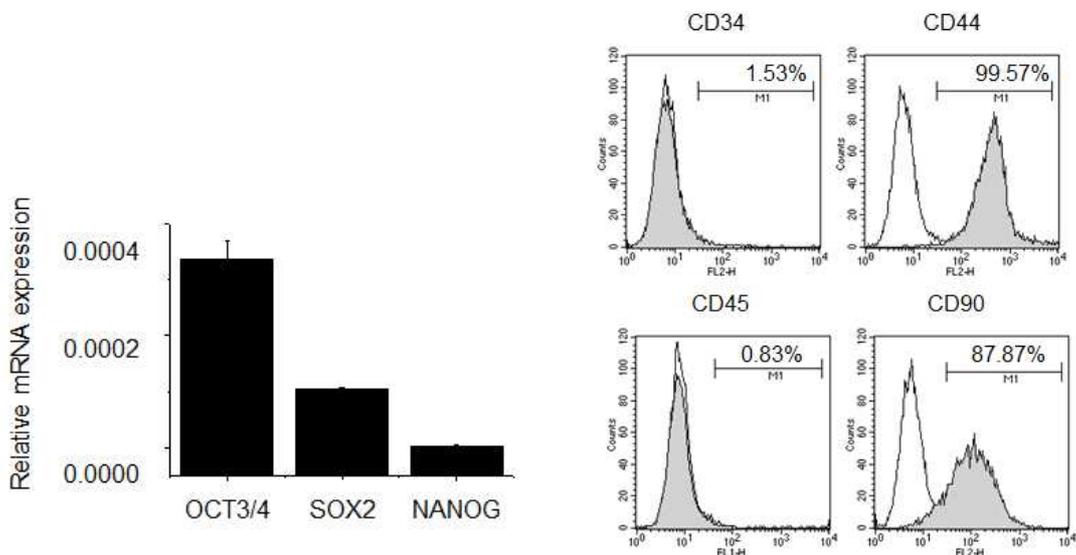


- 혐기성 균과 호기성균에 대한 검사를 실시하여 균이 검출되지 않았음을 확인하였으며 이 시험법은 동물세포치료제의 품질검사 방법 중 무균시험법으로 활용될 것으로 예상함.

- 간엽 줄기세포 특성분석

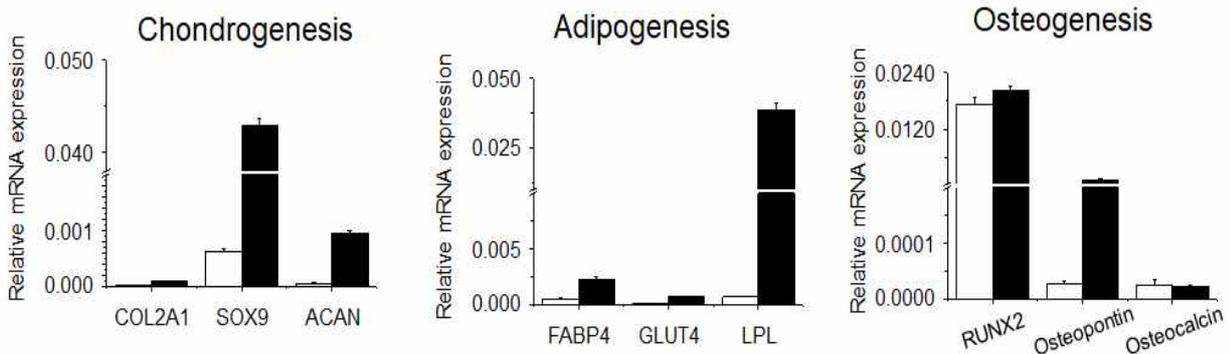


세포 배양 확장성에 대한 평가를 Cumulative population doubling level을 이용하여 실시하였고 계대배양에 따라 세포확장성이 감소하는 것을 확인할 수 있었다.



줄기세포 표지자 OCT3/4와 SOX2, Nanog에 대하여 Quantitative real-time PCR로 확인하였으며

간엽줄기세포의 세포표면 발현 표지자인 CDs 표지자에 대하여 유세포 분석법으로 분석하였다. CD34와 CD45는 음성 발현하였고 CD44와 CD90은 양성 발현하는 것으로 나타났다.



중간엽 줄기세포의 대표적인 특징인 다분화성/다기능성을 확인하기 위하여 연골, 지방, 골 분화에 대하여 대표적인 표지자를 선정하고 표지자 발현 확인을 통해 확인하였다. 반려견용 간엽줄기세포의 경우도 다분화능을 가지고 있음을 확인 할 수 있었다.

○ 반려견용 골세포치료제 평가 가이드라인 마련

반려견 골세포치료제 평가 가이드라인	
1. 제목	4
1.1 교집합	4
1.2 배합	4
2. 개요	4
2.1 배경/목적/의의	4
2.2 평가/비교/사용처/발행/교리서명	5
3. 품질관리사항	5
3.1 제조방법	5
3.2 제조품질	5
3.3 제조품질 검증	6
3.4 품질 관리의 품질관리	6
3.5 확인사항	6
4. 전달/공부/관리	7
4.1 사용법/관리	7
4.2 사용법/관리	7
4.3 사용법/관리	7
4.4 사용법/관리	7
4.5 사용법/관리	7
4.6 사용법/관리	7
4.7 사용법/관리	7
4.8 사용법/관리	7
4.9 사용법/관리	7
4.10 사용법/관리	7
4.11 사용법/관리	7
4.12 사용법/관리	7
4.13 사용법/관리	7
4.14 사용법/관리	7
4.15 사용법/관리	7
4.16 사용법/관리	7
4.17 사용법/관리	7
4.18 사용법/관리	7
4.19 사용법/관리	7
4.20 사용법/관리	7
4.21 사용법/관리	7
4.22 사용법/관리	7
4.23 사용법/관리	7
4.24 사용법/관리	7
4.25 사용법/관리	7
4.26 사용법/관리	7
4.27 사용법/관리	7
4.28 사용법/관리	7
4.29 사용법/관리	7
4.30 사용법/관리	7
4.31 사용법/관리	7
4.32 사용법/관리	7
4.33 사용법/관리	7
4.34 사용법/관리	7
4.35 사용법/관리	7
4.36 사용법/관리	7
4.37 사용법/관리	7
4.38 사용법/관리	7
4.39 사용법/관리	7
4.40 사용법/관리	7
4.41 사용법/관리	7
4.42 사용법/관리	7
4.43 사용법/관리	7
4.44 사용법/관리	7
4.45 사용법/관리	7
4.46 사용법/관리	7
4.47 사용법/관리	7
4.48 사용법/관리	7
4.49 사용법/관리	7
4.50 사용법/관리	7
4.51 사용법/관리	7
4.52 사용법/관리	7
4.53 사용법/관리	7
4.54 사용법/관리	7
4.55 사용법/관리	7
4.56 사용법/관리	7
4.57 사용법/관리	7
4.58 사용법/관리	7
4.59 사용법/관리	7
4.60 사용법/관리	7
4.61 사용법/관리	7
4.62 사용법/관리	7
4.63 사용법/관리	7
4.64 사용법/관리	7
4.65 사용법/관리	7
4.66 사용법/관리	7
4.67 사용법/관리	7
4.68 사용법/관리	7
4.69 사용법/관리	7
4.70 사용법/관리	7
4.71 사용법/관리	7
4.72 사용법/관리	7
4.73 사용법/관리	7
4.74 사용법/관리	7
4.75 사용법/관리	7
4.76 사용법/관리	7
4.77 사용법/관리	7
4.78 사용법/관리	7
4.79 사용법/관리	7
4.80 사용법/관리	7
4.81 사용법/관리	7
4.82 사용법/관리	7
4.83 사용법/관리	7
4.84 사용법/관리	7
4.85 사용법/관리	7
4.86 사용법/관리	7
4.87 사용법/관리	7
4.88 사용법/관리	7
4.89 사용법/관리	7
4.90 사용법/관리	7
4.91 사용법/관리	7
4.92 사용법/관리	7
4.93 사용법/관리	7
4.94 사용법/관리	7
4.95 사용법/관리	7
4.96 사용법/관리	7
4.97 사용법/관리	7
4.98 사용법/관리	7
4.99 사용법/관리	7
4.100 사용법/관리	7

최종적으로 시험결과 및 방법 등을 취합하여 반려견 골세포치료제 평가 가이드를 만듦

○ 사업화성과 및 매출실적

- 사업화 성과

항목	세부항목			성 과	
사업화 성과	매출액	개발제품	개발후 현재까지	1.87억원	
			향후 3년간 매출	7억원	
		관련제품	개발후 현재까지	4.95억원	
			향후 3년간 매출	15억원	
	시장 점유율	개발제품	개발후 현재까지	국내 : 5 % 국외 : 0 %	
			향후 3년간 매출	국내 : 10 % 국외 : 5 %	
		관련제품	개발후 현재까지	국내 : 5 % 국외 : 0 %	
			향후 3년간 매출	국내 : 10 % 국외 : 5 %	
	세계시장 경쟁력 순위	현재 제품 세계시장 경쟁력 순위			
		3년 후 제품 세계 시장경쟁력 순위			

- 사업화 계획 및 매출 실적

항 목	세부 항목		성 과		
사업화 계획	사업화 소요기간(년)		3년		
	소요예산(백만원)		1,500		
	예상 매출규모 (억원)		현재까지	3년후	5년후
			0	10	25
	시장 점유율	단위(%)	현재까지	3년후	5년후
		국내	5	10	15
국외		1	5	10	
향후 관련기술, 제품을 응용한 타 모델, 제품 개발계획		반려동물용 인대·건용 세포치료제 반려동물용 아토피 및 알러지 피부세포치료제			
무역 수지 개선 효과	(단위: 억원)	현재	3년후	5년후	
	수입대체(내수)	1	10	15	
	수 출	0	10	20	

■ 마케팅 전략

- 동물병원을 대상으로한 동물세포치료제 홍보 및 영업예정
- 대구/경북지역 거점 마련 : 경북대학교 수의과대학을 중심으로한 대구/경북지역 동물세포치료제 관련 컨소시엄 구성 예정
- 서울/경기 지역 : 대형 동물병원을 중심으로한 컨소시엄 구성
- 초기에는 구성된 컨소시엄을 중심으로 동물세포치료제 Field임상 자료 확보 및 홍보

■ 가격 경쟁력 확보

- 개발된 동중세포치료제를 대량배양하여 동결보관하고 판매하는 전략을 수립, 차후 세포치료제 생산을 자동화함으로써 제품의 성능을 일정하게 유지하고 생산단가를 낮추기 위해 자동화 장비 개발을 진행중임.

■ 동물세포치료제 제품형태 및 추가 개발

- 반려견용 골세포치료제 : SmartCell®cBone으로 상용화 예정
- 주요 거점에 구성된 컨소시엄을 중심으로한 상용화와 동물의약품 허가를 통한 시장 공략 2 track으로 사업화 계획을 수립
- 중간엽줄기세포 기반의 세포치료제 파이프라인 확대 예정
- 오믹스를 조합한 단백질 멀티 스크리닝 시스템을 적용하여 추가 연구개발함으로써 MOA를 명확히 한 제품을 상용화 할 계획임.

■ 생산 시설 마련

2021년 오송에 동물세포치료제 GMP 생산시설 마련 예정

■ 특허 출원 및 등록 (한국, PCT) - 글로벌 진입 예정

- 3차원 세포 배양, 3차원 세포 분화 특허가 등록됨.
- 현재 미국, 유럽 특허 진입중임.

명칭	출원인	출원국	등록일	등록번호
3 차원 세포배양 시스템 및 이를 이용한 세포 배양 방법 3D CELL CULTURE SYSTEM AND CELL CULTURE METHOD USING THE SAME	세포바이오	대한민국	2016.12.12	제 10-1687291
		일본	2019.02.08	JP6475322
하이드로겔을 이용한 3 차원적 줄기세포 골분화 유도 방법 3D METHOD FOR OSTEOGENIC DIFFERENTIATION USING HYDROGEL	세포바이오	대한민국	2018.05.16	제 10-1860301
		일본	2019.02.08	JP6475323

- 반려견용 세포치료제에 대한 특허 출원

명칭	출원인	출원국	출원일	출원번호
갈색지방 유래 간엽줄기세포의 골분화를 이용한 개과 동물의 골 조직 재생용 세포치료제 및 이것의 제조 방법	세포바이오	대한민국	2018.10.23	10-2018-0126642

- 세포배양 자동화에 대한 특허 출원

명칭	출원인	출원국	출원일	출원번호
세포배양 자동화 방법	세포바이오	대한민국	2018.04.26	10-2018-0048788

■ 유럽의 GST(Global Stem Cell Technology)사와의 연계

- 유럽의 동물 관련 시장은 국내 시장과 매우 큰 차이가 나며 동물에 대한 고품질의 보건의료 서비스에 많은 투자를 하고 있음.
- 벨기에의 GST사의 경우, 말의 인대건 및 연골을 대상으로 하는 치료제가 2018년 6월 21일 동물용 세포치료제로서는 세계 최초로 EU EMA 허가를 획득함.
- GST사는 2018년 12월 11일 독일의 베링거잉겔하임 (Boehringer Ingelheim Animal Health Business Unit)과 동물용 근골격계 세포치료제에 대해 독점판매 계약을 맺음
- 베링거잉겔하임은 전 세계적으로 150여개 이상의 동물의약품 시장에 진출해 있으며 동물수의 분야에서 397억유로. 년 매출을 올리고 있음.
- 본 사는 향후 GST사와 연계하여 공동연구와 상용화, 기술이전 등을 계획하고 있음.

3. 목표 달성도 및 관련 분야 기여도

3-1. 목표

개의 간엽줄기세포 배양 및 분화 조건을 확립하고 3차원 골분화 방법을 적용하여 골세포치료제 개발을 위한 프로토콜을 확보하고자 하며, 소동물 모델에서 세포치료제의 안전성과 유효성을 검증하고 최종적으로 목적 동물인 개의 생체 내 유효성을 확인함으로써 동물세포치료제 허가를 위한 근거를 확보하는 것을 목표로 함.

3-2. 목표 달성여부

성과목표	자 체 평 가
<ul style="list-style-type: none"> 3차원 골분화 프로토콜 완성 	<ul style="list-style-type: none"> 다양한 하이드로겔 비교 평가하여 최적의 겔 조건 확립 골분화 유도 시간 확립 최종 프로토콜 확보 분화 유도된 세포의 बैं킹 조건 확립 (특허 등록 2건 저온보존제 제10-1668743호, 동결보존제 US10,104,881 B2) 프로토콜이 확보된 경우에는 SOP로 작성 특허 등록 2건 (3차원 세포 배양 제10-1687291, 3차원 세포분화 제10-1960301) 특허 출원 : 10-2018-0126642 (골세포치료제 특허) 논문 출간 Cell Death and Disease(2018)9:1092 Canine 간엽줄기세포용 배지 개발 및 상용화
<ul style="list-style-type: none"> 치료제의 유효성 및 안전성 평가 	<ul style="list-style-type: none"> 종양원성, 투여독성, 장기독성, 분포시험 실시 종양원성 시험 완료 및 결과 확보 장기독성 시험 완료 및 결과 확보 투여독성 시험완료 및 결과 확보 분포시험 (4주 12주)을 완료하고 장기를 적출하여 PCR분석 진행 세포치료제에 QD2 형광 나노 입자를 이입하여 4주간 세포 행동 추적 결과 확보 소동물 유효성 결과 확보
<ul style="list-style-type: none"> (반려동물) 임상적용 유효성평가 기법 확립 및 최적화 	<ul style="list-style-type: none"> 줄기세포 이식을 위한 두개골 모델을 비롯하여 요골 결손모델 등 시험동물 모델을 확립 요골 부분 결손모델의 경우는 GLP기관인 케온에 기술 이전하여 종양원성, 투여독성, 분포시험 등을 실시하는데 이용함. 줄기세포-지지체 복합체의 중대동물 적용 프로토콜 구축 임상 골결손모델에서의 이식술 확립 및 구축 연구개발 결과를 토대로 동물용 골세포치료제 가이드라인 마련

<ul style="list-style-type: none"> • 임상적용후보 세포-지지체 복합체의 생체내 유효성 평가 	<ul style="list-style-type: none"> • 줄기세포를 지지하는 치료용지지체 적용 프로토콜 구축 • 세포-지지체 복합체의 생체 내 유효성 평가를 성공적으로 진행 • 목적동물 임상적용 유효성 평가 자료 확보
<ul style="list-style-type: none"> • 임상적용후보 세포-생체내 유효성 평가 	<ul style="list-style-type: none"> • 세포치료제의 적응증 확대를 위한 새로운 bone segmental defect 모델을 확립하여 그 유효성을 추가 검증함으로써 대동물 임상시험을 위한 최종 후보세포치료제 선정에 유용한 기초자료를 확보하였음. • 당초 계획서상의 최종 후보세포치료제의 선정은 3차년도 연구내용에 계획되어 있으나 시급한 과제 진행일정을 맞추기 위해 본 차년도에 완료하였고 추가로 목적동물을 10마리 선정하여 동물시험을 실시함.
<ul style="list-style-type: none"> • 생체 내(In Vivo) 생물학적 활성 평가 및 모니터링 	<ul style="list-style-type: none"> • 주관기관에서 개발한 형광 q-dot 나노입자를 활용하여 표지된 세포를 실험동물에 이식 후 생체 내에서의 세포의 생물학적 활성을 평가함으로써 이종세포 이식 시 필수적이거나 유해한 면역억제제의 처리 방법을 생체 내에서 이식세포의 활성에 영향을 주지 않는 범위에서 처리할 수 있도록 최적화하였음. • 본 결과는 동물세포 치료제 개발을 위한 체내 이식세포의 분포영향 평가에 있어서 가이드라인 제시를 위한 기초자료로 활용될 수 있음.

3-3. 목표 미달성 시 원인(사유) 및 차후대책(후속연구의 필요성 등)

○ 과제별 연구개발의 목표 및 내용

- 제1세부 및 제3 협동 (세포바이오, 농림축산 검역본부)

- 개의 조직으로부터 세포치료제 개발의 원료가 되는 세포 확보 및 특성 분석
- 원료 세포의 정도관리
공여 동물에 대한 기본적인 정보 확보
바이러스 · 박테리아 확인
유전자 변형 등 확인
- 개의 조직 유래 간엽줄기세포의 배양 최적화 조건
기존 세포 배지의 성능 향상
대량배양 조건
세포치료제용 원료 세포의 계대 및 동결보존 이후 생존율 확인
- 개의 조직유래 줄기세포의 3차원 분화 조건 확립
배양용기의 물성에 따른 분화 차이 확인
분화세포의 특성 분석
- In vitro 면역 반응 확인
- 특성 분석이 완료된 골분화 세포의 제공

- 제 1협동 (경북대학교)

- 줄기세포기반 골세포치료제의 효능평가를 위한 질환동물모델 확립

- 반려동물 임상적용 기법 확립 및 최적화
 - 임상적용후보 세포 -지지체 복합체의 생체 내 유효성 평가
 - 개에서 최종 선정된 임상적용치료제의 유효성 평가
- 제 2협동 (동국대학교)
- 골분화 유도 반려견유래 간엽줄기세포의 생쥐 (mouse) 이소성 (ectopic) 골형성 능력검증
 - In vivo 모니터링을 위한 NIR계 형광단백질 발현 렌티바이러스 시스템 제조
 - 반려견용 세포치료제의 골재생 효능검증을 위한 최적 골재생 소동물 모델의 선정
 - In vivo 모니터링을 통한 소동물 내 이식세포의 생체 내 추적기술 최적화
 - 선정된 골재생 소동물 모델에서 골분화가 유도된 반려견용 세포치료제의 골재생 효능 검증
 - 소동물 시험을 통한 중앙원성 및 면역원성 확인

○ 연차별 연구개발의 목표 및 내용

구분	연구개발의 목표	연구개발의 내용	비고
1차 년도	간엽줄기세포 치료제 후보물질의 평가기준 확립	<ul style="list-style-type: none"> • 효능/효과 평가기준 정립 • 안전성/독성 평가기준 정립 • 임상지표 및 예후판정 기준 정립 	1세부 및 3협동
	세포치료제용 간엽 줄기세포 확보 및 생산공정 표준화	<ul style="list-style-type: none"> • 세포치료제용 간엽줄기세포 추출기법 구축 • 간엽줄기세포 추출 배양 및 이송 - 생산공정 표준화(표준프로토콜 확립) • 세포치료제용 간엽줄기세포의 성장, 순도 및 역가 평가지표 확립(적용 최적화) • 미분화 간엽줄기세포의 in vitro 면역반응 확인 • 간엽줄기세포 보존 시험, 안정성 시험 및 cell banking 	1세부 및 3협동
	세포치료제의 효능평가를 위한 질환 동물모델 선별 및 확립	<ul style="list-style-type: none"> • 개에서의 급만성 골결손 동물질환모델 제작 및 검증 • 골질환별 중·대형동물모델에서의 생체적합성 및 유효성 평가지표 확립 • 개에서 세포치료제의 생체내 전달기법 확립 및 검증 (direct injection 및 생체재료전달식) 	1협동
	골분화 유도 반려견유래 간엽줄기세포의 생쥐 (mouse) 이소성 (ectopic) 골형성 능력검증	<ul style="list-style-type: none"> • 누드마우스 (N=5) 피하에 골분화 유도 세포 및 미분화 세포를 다양한 비율로 섞어 이식한 후 이식세포의 골형성 능력을 검증함. • 세포 이식 약 4주후 마우스 피하에 형성된 골조직을 박리하여 골형성 정도를 평가함. • 평가방법으로는 조직의 ALP 및 alizarin red 염색, Goldners' trichrome 염색, microCT 분석을 사용하고 이를 통하여 최적의 분화 및 미분화 세포의 생체 	2협동

		내 이식비율을 선정함.	
	In vivo 모니터링을 위한 형광단백질 발현 시스템 제조	<ul style="list-style-type: none"> • NIR (Near Infrared)계 단백질 (iRFP) 발현 렌티바이러스 벡터를 클로닝함. • iRFP-렌티바이러스를 제조함. • iRFP-형광발현 세포의 in vitro 모니터링 효과 검증. 	2협동

구분	연구개발의 목표	연구개발의 내용	비고
2차 년도	간엽줄기세포의 3차원 골분화	<ul style="list-style-type: none"> • 2D와 3D분화 비교 • 분화 표지자 확인 • 골분화 세포의 성능 확인과 객관적 평가 • 골분화 시스템의 프로토콜 완성 • in vitro 면역반응 관련 지표 확인 	1세부 및 3협동
	임상적용 유효성평가 기법 확립 및 최적화	<ul style="list-style-type: none"> • 줄기세포치료제의 골전달 및 재생 능력 및 기전 확립 • 줄기세포 중대동물 적용 프로토콜 확립 • 임상에서의 적용 시 전달기법 및 이식술 확립 및 검증 	1협동
	임상적용후보 세포-생체 내 유효성 평가	<ul style="list-style-type: none"> • 세포치료용 줄기세포의 성장, 순도 및 역가 평가지표 확립(적용 최적화) • 지지체에 의한 in vitro /in vivo 독성 여부 확인 	1세부 및 3협동, 2협동 (in vivo 독성)
		<ul style="list-style-type: none"> • 다양한 타입의 치료용 Cell-matrix 복합체(hydrogel 또는/와 다공성 지지체;scaffold)에 대한 적용 프로 토콜 확립(injection type, scaffold type, matrix type) • 후보 Cell-matrix 복합체의 유효성 평가 수행 	1협동
	생체 내(In Vivo) 생물학적 활성 평가 및 모니터링	<ul style="list-style-type: none"> • 동물 모델 내 생착율 ·분포 평가 • 동물모델 내 세포치료제의 검증 • 동물모델에서 지방줄기세포치료제의 안전성(독성) 평가 • In vivo 모니터링을 통한 소동물 내 이식세포의 생 체 내 추적기술 최적화 	2협동

구분	연구개발의 목표	연구개발의 내용	비고
3차 년도	최종 선정된 임상적용치료제 의 유효성 평가	<ul style="list-style-type: none"> • 동물세포 치료제 허가용 SOP 확립 • 동물세포 치료제 Delivery Vehicles에서의 생존율 확인 	1세부
		<ul style="list-style-type: none"> • 최종선정된 세포 치료제의 개에서의 생체내 유효성평가 (골유도, 전달, 재생 능력 평가) • 생체 내 생물학적 활성평가 및 임상지표 모니터링 • 반려동물 임상적용시 전달기법 최적화 및 이식술 최적화(최소침습적 주입기법 확립, 이식수술시 최대 생존능력과 효능 보존 이식술 확립) 	1협동
	세포치료제의 평가	<ul style="list-style-type: none"> • 소동물에서 유효성 평가 • 투여 독성 시험 및 평가 • in vivo 종양원성 시험 및 면역원성 평가 	2협동
	반려동물임상연구 확립 및 동물의약품 허가를 위한 자료 마련	<ul style="list-style-type: none"> • 동물의약품 허가를 위한 자료 확보 SOP 및 기준 설정 : 임상프로토콜 작성, 대상patient 선정 기준 설정, 비교평가 대상설정, 효능/효과, 안전성/독성 평가지표 설정 • 실제 patient를 대상으로 한 임상연구수행 (randomized, control veterinary clinical test) 	1세부와 2협동, 3협동

○ 목표 미달성 시 원인(사유) 및 후속연구의 필요성 등 차후 대책을 구체적으로 기술

* 후속연구 필요성

동물세포치료제 관련 법안 발표로 인하여 시술자의 판단에 무게가 실리게 된 만큼 동물병원에서 이미 줄기세포를 동물치료 방법의 하나로 이용되고 있어 치료제 허가의 의미가 상업적인 부분에서는 크지 않게 됨.

따라서, 개발된 본 세포치료제는 홍보를 통해 선 상업화를 진행하고자 계획을 수정하였음.

줄기세포 이식에 대한 안전성 평가 부분은 꼭 필요하다고 생각됨에 따라 시험 평가법에 대한 후속 개발이 필요하다고 사료됨.

4. 연구결과의 활용 계획 등

- 배양기술 확보를 통한 세포 은행 제작 및 공급과 같은 새로운 서비스 분야 창출
- 특성분석이 완료된 개과 동물의 지방조직유래 간엽줄기세포의 일부는 세포치료제 개발용으로 이용될 것이며 또한 연구용 세포로서 연구자들에게 공급함으로써 매출 확대 기대
- 개의 지방유래 간엽줄기세포에 최적화된 배양액을 포함하는 배양요소는 개발 이후 객관적 성능 평가가 완료되는 즉시 상용화함으로써 매출로 연결 되고 있으며 지속적인 매출 증가가 있을 것으로 기대
- 개발될 in vitro 3차원 골분화 모델은 연구개발서비스에 이용될 것으로 예상됨.
- 소동물 실험 모델은 다른 경우의 세포치료제 개발에 모델로 이용될 수 있을 것임.
- 세포 추적 시스템의 확보는 생체 내 세포 추적 뿐 아니라 세포의 3차원 배양 시 세포의 형태적 특성 혹은 세포의 생존 여부를 파악 할 때도 이용할 수 있을 것으로 판단됨.
- 확보한 대동물 질환모델 및 유효성평가기법은 골격계 질환 세포치료제의 유효성/안전성을 평가할 수 있는 표준적인 시스템으로 제공되어 연구자와 개발자에게 활용될 수 있음.
- 골세포치료제는 세포치료제의 전달체, 골유도인자의 전달시스템으로 개발되어 골격계질환 치료제로 제품화 및 기술이전을 통하여 실용화 될 수 있음.
- 질환특이세포치료제 제조기술은 난치성 질환 치료제로서 범용으로 적용이 가능하며, 조직공학, 생체재료, 재생의학 분야의 의료기술 및 치료제 개발에 기여할 수 있음.
- 세포치료제 개발 시 공여조직의 정도관리에 대한 시험법은 앞으로 새로운 동물세포치료제 개발에 예시로 이용될 수 있을 것임.
- 본 연구개발에 의해 제시될 유효성 및 안전성 평가 방법은 개발될 동물세포치료제가 동물 의약품으로 허가되는데 중요한 요인일 것으로 예상되며 후속 개발될 제품의 예시가 될 것임.
- 최근 동물세포치료제에 대한 가이드라인 발표로 인하여 동물세포치료제 관련 급격한 환경 변화가 있는 상황에서 관련 새로운 시장이 개척되고 있어 안전성 및 안정성, 유효성이 확보된 세포치료제로 시장에 접근한 다면 신뢰성을 높일 수 있을 것으로 기대됨.

붙임. 참고문헌

1. 식품의약품안전처, 보도자료 (2014.2.27.)
2. 2014년 줄기세포연구개발 시행계획 (범부처)
3. 2017년 한국은행 경제통제시스템 ECOS, 동물병원 월간 카드승인금액
4. Kadiyala, S., R. G. Young, et al. (1997). Culture expanded canine mesenchymal stem cells possess osteochondrogenic potential in vivo and in vitro. *Cell Transplant* 6(2): 125-134.
5. Volk, S. W., D. L. Diefenderfer, et al. (2005). Effects of osteogenic inducers on cultures of canine mesenchymal stem cells. *Am J Vet Res* 66(10): 1729-1737
6. Hatoya, S., R. Torii, et al. (2006). Isolation and characterization of embryonic stem-like cells from canine blastocysts. *Mol Reprod Dev*. 73(3): 298-305
7. Neupane, M., C. C. Chang, et al. (2008). Isolation and characterization of canine adipose-derived mesenchymal stem cells. *Tissue Eng Part A* 14(6): 1007-1015
8. Seo, M. S., Y. H. Jeong, et al. (2009). Isolation and characterization of canine umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells. *J Vet Sci* 10(3): 181-187
9. Wilcox, J. T., E. Semple, et al. (2009). "Characterization of canine embryonic stem cell lines derived from different niche microenvironments. *Stem Cells Dev*. 18(8): 1167-1178
10. Vaags, A. K., S. Rosic-Kablar, et al. (2009). "Derivation and characterization of canine embryonic stem cell lines with in vitro and in vivo differentiation potential. *Stem Cells* 27(2): 329-340
11. Vieira, N. M., V. Brandalise, et al. (2010). Isolation, characterization, and differentiation potential of canine adipose-derived stem cells. *Cell Transplant* 19(3): 279-289
12. Piedrahita, J. A., S. Koh, et al. (2011). Generation and Characterisation of induced pluripotent stem cells (iPSCs) from adult fibroblasts. *Reprod Fertil Dev* 24(1): 285
13. Filioli Uranio, M., L. Valentini, et al. (2011). "Isolation, proliferation, cytogenetic, and molecular characterization and in vitro differentiation potency of canine stem cells from foetal adnexa: a comparative study of amniotic fluid, amnion, and umbilical cord matrix." *Mol Reprod Dev* 78(5): 361-373
14. Whitworth, D. J., D. A. Ovchinnikov, et al. (2012). Generation and Characterization of LIF-dependent Canine Induced Pluripotent Stem Cells from Adult Dermal Fibroblasts. *Stem Cells Dev*. 21(12): 2288-97
15. Antonio José Villatoro et al. (2018) Allogeneic adipose-derived mesenchymal stem cell therapy in dogs with refractory atopic dermatitis: clinical efficacy and safety. *Vet Rec*. pii: vetrec-2018-104867
16. Lauren K.Dobson et al. (2018) Canine Mesenchymal Stem Cell-Mediated Bone Regeneration is Enhanced in the Presence of Sub-Therapeutic Concentrations of Rbmp-2 in a Murine Critical-Sized Calvarial Defect. *Vet Comp Orthop Traumatol*. 2018; 31(S 02): A1-A25
17. VET-Stem Co.과 2013년 세계 동물보건 산업 시장 리뷰, IFAH, 2014, APPA (Animal Pet Products Association)
18. 「동물용의약품등취급규칙」 제50조 (동물약사감시원)

19. 동물약사감시요령(농식품부 훈령 제116호)
20. 동물용의약품등 안전성·유효성 심사에 관한 규정(농림축산검역본부 고시 제2011-13호)
21. 동물용의약품등 제조허가 및 품목허가등 지침(농림축산검역본부 고시 제2011-18호)
22. 「약사법」 제53조(동물용의약품의 국가검정)
23. 「동물용의약품등 취급규칙」 제4장 동물용의약품의 국가검정
24. 「국가검정 동물용의약품 검정기준」(농림축산검역본부고시 제2011-4호)
25. 「동물용의약품 유전자치료제·세포치료제의 안전성·유효성 심사관련 규정 및 임상시험 가이드라인」 2016년 농림축산검역본부 용역연구사업, 강원대학교 윤장원
26. 동물용 세포치료제 안전성 평가 가이드라인, 2018.06.11. 동물약품평가과-5460

[별첨]

자체평가의견서

1. 과제현황

		과제번호	815006-3		
사업구분	기술사업화지원사업				
연구분야	수의과학		과제구분	단위	
사업명	기술사업화지원사업			주관	
총괄과제	기재하지 않음		총괄책임자	기재하지 않음	
과제명	반려견의 지방유래 간염줄기세포를 이용한 골세포치료제 개발 및 사업화		과제유형	응용	
연구기관	(주)세포바이오		연구책임자	이순례	
연구기간 연구비 (천원)	연차	기간	정부	민간	계
	1차년도	2015.10.23. - 2016.10.22	280,000	93,350	373,350
	2차년도	2016.10.23. - 2017.10.22	280,000	93,350	373,350
	3차년도	2017.10.23. - 2018.10.22	280,000	93,350	373,350
	계		840,000	280,050	1,120,050
참여기업	(주)세포바이오				
상대국		상대국연구기관			

※ 총 연구기간이 5차년도 이상인 경우 셀을 추가하여 작성 요망

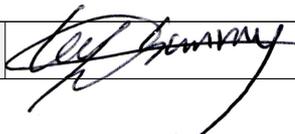
2. 평가일 : 2019.04.08

3. 평가자(연구책임자) :

소속	직위	성명
(주)세포바이오	연구부소장	이순례

4. 평가자(연구책임자) 확인 :

본인은 평가대상 과제에 대한 연구결과에 대하여 객관적으로 기술하였으며, 공정하게 평가하였음을 확약하며, 본 자료가 전문가 및 전문기관 평가 시에 기초자료로 활용되기를 바랍니다.

확약	
----	---

I. 연구개발실적

1. 연구개발결과의 우수성/창의성

■ 등급 : (아주우수, **우수**, 보통, 미흡, 불량)

세포배양요소 개발 중 배지의 경우는 기존배지가 3계대 이후부터는 세포가 잘 자라지 않아 세포확장성에 어려움이 있어 5계대까지 잘 자라는 배지를 개발함.

세포치료제 개발을 위해서는 단분 배양된 간엽줄기세포가 아니라 골분화 초기 유도된 세포를 이용함으로써 골세포치료제로서의 성능을 향상시켰으며 이는 소동물 시험과 목적동물 시험을 통해 효력을 입증하였음.

특허등록 4건 : 동결보존제, 저온보존제, 3차원 배양방법, 3차원 분화방법

특허출원 2건 : 세포치료제, 반려견용 골세포치료제

초록발표 : 13건 (구두 4건 포함)

홍보 : 중앙일보 등 언론 홍보, 줄기세포학회, 국제세포치료제 학회등 부스 홍보

논문발표 : 1건

제품 상용화 : 동물간엽줄기세포용 배양배지, 분화배지 등, 매출 발생

시제품 제작 : 동물세포치료제 관련 시제품 제작

반려견유래 간엽줄기세포 전용 세포배양액을 개발함으로써 기존의 배양액의 문제점인 낮은 세포확장성 문제를 극복하고 5계대 이상 세포를 계대배양 할 수 있게 되어, 세포치료제 생산시 발생하는 hurdle 중 하나인 세포 확장성의 문제를 해결하였으며 골세포치료제 개발에 3차원 배양 및 분화방식을 적용하여 치료효과가 우수한 반려견용 세포치료제를 개발하였음.

2. 연구개발결과의 파급효과

■ 등급 : (**아주우수**, 우수, 보통, 미흡, 불량)

세포배양요소의 경우는 세포증식에 효과적인 배지로 즉시 상용화 되어 매출을 발생하고 새로운 산업의 기반이 될 수 있을 것으로 예상함.

세포치료제 개발의 경우는 안전성 평가 모델을 확보함으로써 소동물 및 중대동물 시험에 활용될 것으로 기대하며, 종양원성·투여 독성 등의 결과는 세포치료제 개발 및 적용 시에 참고자료로 이용될 수 있을 것임.

안전성 및 유효성이 확실한 동물세포치료제는 초기 도입단계에서 사용자들에게 세포치료제 사용에 대한 우려를 잠식시키고 신뢰를 줄 수 있을 것으로 기대함.

동물의약품분야에 생물학적 제제에 대한 가이드라인 발표이후 동물세포치료제 환경이 급격히 변화하고 있는 상황에서 허가보다는 시술자의 권한이 커진 만큼 본 연구개발의 결과는 시술자의 판단에 중요한 영향을 미칠 것으로 예상됨.

3. 연구개발결과에 대한 활용가능성

■ 등급 : (아주우수, 우수, 보통, 미흡, 불량)

동물용 배양액과 분화배지는 동물세포 배양과 분화에 적용될 수 있을 것으로 기대되며 활용도 또한 높을 것임.
동물세포치료제는 동물병원과 반려견주 등을 대상으로 한 홍보를 통해 상용화함으로써 매출향상을 기대하고 있음.

4. 연구개발 수행노력의 성실도

■ 등급 : (아주우수, 우수, 보통, 미흡, 불량)

- 개의 간엽줄기세포 배양 및 분화 조건을 확립 : 간엽줄기세포 배양 및 분화를 위한 배지를 개발하여 각각 상용화 하였으며, 반려견 세포치료제를 위한 원료세포 은행 확보. 동결보존제 (미국특허 확보 2018)와 저온보존제에 대한 2건의 특허 등록
- 3차원 골분화 방법을 적용하여 골세포치료제 개발을 위한 프로토콜 확보 : 단순배양이 아닌 빠른 골분화 유도를 위해 3차원 분화방법을 적용하였고 이에 대해서는 특허 2건이 등록되었고 2건의 특허가 출원되었음.
- 소동물 모델에서 세포치료제의 안전성과 유효성 검증
 - Rat tibia defect 모델을 이용하여 종양원성, 투여독성, 장기독성, 분포시험을 실시하고 그 결과를 확보함
 - Rat Radius defect 모델을 이용하여 유효성 평가를 진행하여 우수한 결과를 확보함
- 최종적으로 목적 동물인 개의 생체 내 유효성을 확인
 - 목적동물인 개과 동물, 비글종을 이용하여 유효성 평가를 진행하였고 우수한 결과를 확보함
- 동물세포치료제를 위한 안전성 및 유효성 근거 확보
 - 동물세포치료제를 위한 안전성 및 유효성을 확인함.
 - 확인된 결과를 기반으로 골세포치료제 가이드라인을 완성함.
 - 대한수의학회를 통해 발표함

5. 공개발표된 연구개발성과(논문, 지적소유권, 발표회 개최 등)

■ 등급 : (아주우수, 우수, 보통, 미흡, 불량)

특허등록 4건 : 동결보존제, 저온보존제, 3차원 배양방법, 3차원 분화방법

특허출원 2건 : 세포치료제, 반려견용 골세포치료제

초록발표 : 13건 (구두 4건 포함)

홍보 : 중앙일보 등 언론 홍보, 줄기세포학회, 국제세포치료제 학회 등 부스 홍보

논문발표 : 1건

연구개발 기간 동안 4건의 특허가 등록되었고 2건의 특허가 출원되었으며 13건의 초록발표가 있었음. 그 중 4건의 경우는 대한수의학회, 한국줄기세포 학회, 한국생물과 학협회 등 구두 발표가 있었음.

II. 연구목표 달성도

세부연구목표 (연구계획서상의 목표)	비중 (%)	달성도 (%)	자체평가
간엽줄기세포 치료제 후보물질의 평가기준 확립	5	100	반려견용 골세포치료제 가이드라인을 통해 평가기준 제시
세포치료제용 간엽 줄기세포 확보 및 생산공정 표준화	5	110	개과동물 유래 간엽줄기세포 주 확보 한국 썸벤에서 1회 생산
세포치료제의 효능평가를 위한 질환 동물모델 선별 및 확립	10	100	유효성 및 안전성 평가를 위해 Rat 모델 확립 - Tibia defect model - Radius defect model
골분화 유도 반려견유래 간엽줄기세포의 생쥐 (mouse) 이소성(ectopic) 골형성 능력검증	10	100	피하에 이식하여 이소성 골형성 능력 검증
In vivo 모니터링을 위한 형광 단백질 발현 시스템 제조	10	100	형광발현 유전자를 이입하여 형광 발현 단백질 시스템 제조 형광나노입자를 세포내 이입하여 형광 추적 가능한 모델 개발 (사용 편의성이 높음)
임상적용 유효성평가 기법 확립 및 최적화	10	100	목적동물인 개와 동물을 이용하여 요골 결손모델을 확립함. 결손모델을 위한 프로토콜 마련
임상적용후보 세포-생체 내 유효성 평가	10	100	Rat Radius Defect모델을 이용한 유효성 평가를 완료함
생체 내(In Vivo) 생물학적 활성 평가 및 모니터링	10	100	형광나노입자를 세포내 이입하여 형광추적이 가능한 모델을 개발하고 이를 적용부위에 이식하여 이식한 세포의 이동상을 추적 관찰함
최종 선정된 임상적용치료제의 유효성 평가 (세포치료제의 평가)	20	120	목적동물인 개과동물을 이용하여 유효성 평가를 실시함. - 1차 시험을 완료하고 추가 2차 시험을 진행.
반려동물임상연구 확립 및 동물의약품 허가를 위한 자료 마련	10	100	기시법, 제조방법, 품질자료, 안전성 등의 자료를 확보함.
합계	100점		

III. 종합의견

1. 연구개발결과에 대한 종합의견

지난 3년간 반려견용 골세포치료제를 개발하면서 많은 노하우를 획득할 수 있었고 동물세포치료제라 할지라도 안전성과 안정성이 확실한 세포치료제를 개발하기 위하여 연구를 진행하였다. 이를 통해 생명의 소중함을 깨닫는 계기가 되었으며 국민소득 수준의 향상과 1가구 주택의 증가로 반려동물이 이제 단순히 기르는 동물이 아니라 가족의 범주에 확대 편입되고 있다는 것을 알게 되었다.

그 만큼 반려동물에 대한 의료 수준의 질적 향상은 필수 불가결한 사항이 되었다.

본 연구개발을 통해 세포치료제 적용에 대한 안전성과 유효성에 대해 관심을 가지게 되는 기회가 되기를 바라마지 않으며 동물세포치료제 가이드라인의 발표로 시술자의 책임이 커진 만큼 유효성만큼이나 안전성도 동등한 비중으로 고려하여 세포치료제에 대한 신뢰도가 향상되기를 희망한다.

2. 평가시 고려할 사항 또는 요구사항

동물세포치료제의 환경변화로 동물의약품 허가보다는 시술자의 의지가 더 비중이 커진 만큼 연구개발 초기의 허가에 대한 시급성은 낮아졌다. 따라서, 경제성·시장성의 비중이 큰 기업 입장에서는 현재 개발된 제품에 대한 마케팅 전략의 수립을 통해 시장 창출과 매출 확대에 주력해야 한다고 판단된다.

3. 연구결과의 활용방안 및 향후조치에 대한 의견

개발된 제품에 대한 마케팅 전략 수립을 통해 시장창출과 매출확대에 주력할 예정임
안전성 평가 자료는 새로운 세포치료제 개발에도 도움이 될 것으로 예상하며 적용증 확대 등과 같은 분야 적용될 것임.

안전성 평가 부분에 대해서는 추가 연구비 확보를 통하여 임상 추적 관찰한 필요가 있을 것으로 사료됨

IV. 보안성 검토

--

※ 보안성이 필요하다고 판단되는 경우 작성함.

1. 연구책임자의 의견

--

2. 연구기관 자체의 검토결과

--